

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR



Digitized by the Internet Archive  
in 2024

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service  
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : P. LÉPINE

---

TOME QUATRE-VINGT-TROISIÈME

Juillet-Décembre 1952

---

MASSON ET C<sup>IE</sup>, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine

120, Boulevard Saint-Germain

PARIS

ANNALES

30

L'INSTITUT PASTEUR

LA SECTION DE MICROBIOLOGIE

ANNALES DE MICROBIOLOGIE

ANNALES DE MICROBIOLOGIE

ANNALES DE MICROBIOLOGIE

PARIS — ANC. IMP. DE LA COUR D'APPEL, 1, RUE CASSETTE. — 1952

ANNALES DE MICROBIOLOGIE

ANNALES DE MICROBIOLOGIE

ANNALES DE MICROBIOLOGIE

ANNALES DE MICROBIOLOGIE

ANNALES DE MICROBIOLOGIE

ANNALES



## ANNALES

DE

## L'INSTITUT PASTEUR

**RECHERCHE COMPARÉE DES ANTICORPS SÉRIQUES  
DU TYPE LANSING  
CHEZ LES HABITANTS DE LA PROVINCE DE QUÉBEC. (\*)**

par V. PAVILANIS et P. LÉPINE.

*(Institut d'Hygiène et de Microbiologie  
de l'Université de Montréal.)*

## INTRODUCTION.

Les études sur les anticorps de la poliomyélite indiquent que les groupes de population qui renferment un grand nombre de sujets dont le sérum possède des anticorps virulicides (que nous appellerons ci-après sujets positifs) montrent une morbidité par la paralysie infantile beaucoup plus faible que celle des groupes de population où le nombre des sujets possédant ces anticorps est moins important.

C'est ainsi que dans les pays où la paralysie infantile est rare on trouve constamment qu'une grande proportion des habitants possèdent des anticorps antipoliomyélitiques. Hudson et Lennette [1] en étudiant les anticorps contre la souche MV (souche appartenant au type antigénique II) chez des nègres du Libéria ont trouvé 18 sujets positifs sur

(\*) Travail exécuté avec l'aide du Comité de la Poliomyélite de la Section Québécoise de la Légion Canadienne et du Ministère de la Santé de la Province de Québec (octroi fédéral-provincial à la recherche sur la Santé publique).

20 étudiés. Olitsky et Findlay [2] ont, en examinant 72 habitants autochtones de l'Afrique Occidentale Britannique âgés de 1 à 40 ans, constaté que ces sujets possèdent tous (72/72) des anticorps contre la souche MEF1. Gear [3] rapporte que 100 p. 100 des habitants de la race noire de l'Afrique du Sud ont des anticorps anti-Lansing ; par contre, ces anticorps sont présents chez 80 p. 100 seulement des habitants de race blanche. La poliomyélite est quatre fois plus rare chez les nègres que chez les blancs dans les régions urbaines de l'Afrique du Sud, et dans les territoires habités par les habitants autochtones, cette proportion devient de 1 cas chez les noirs pour 300 cas chez les blancs.

Hammon [4] démontre que dans les îles du Pacifique, où la poliomyélite paralytique est très rare ou inexistante, les tout jeunes enfants (moins de un an) possèdent déjà des anticorps anti-Lansing en majeure proportion. De même, Sabin [5] a trouvé chez les enfants de Corée et d'Okinawa, où la poliomyélite paralytique est rare, un plus grand nombre de sujets positifs que chez les enfants de même âge à Cincinnati. Turner [6] a vu que les nègres de Baltimore possèdent des anticorps anti-Lansing dans une proportion plus grande que les blancs. Il indique, de plus, que le taux annuel des cas de paralysie infantile est de deux à trois fois plus grand chez les blancs que chez les noirs. Les résultats de Turner concordent avec ceux de Collins [7] qui trouve que dans les Etats du Nord-Est des Etats-Unis la morbidité par poliomyélite est quatre fois plus grande chez les blancs que chez les noirs. Les différences de morbidité ne dépendent pas de différences raciales mais du mode de vie des différents groupes dans ces régions : dans les Etats du Sud des Etats-Unis, la morbidité des blancs devient à peu près identique à celle des noirs. Les Chinois qui habitent Hawaï ont plus rarement la poliomyélite paralytique que les Caucasiens [8], mais les Chinois habitant San-Francisco montrent une morbidité deux fois plus grande que les Caucasiens [9].

En contraste avec ces résultats, Paul et Riordan [10], Paul, Riordan et Melnick [11], Clark et Rhodes [12] ont trouvé qu'une faible proportion seulement des Esquimos possèdent des anticorps antipoliomyélitiques : les épidémies d'Alaska, de la baie d'Hudson [13, 14, 15] et du Groenland [16] montrent parallèlement une grande sensibilité des Esquimos à la poliomyélite.

Lorsque l'on considère une même population, on observe que les individus qui ont eu la paralysie infantile (convalescents) possèdent des anticorps antipoliomyélitiques dans une proportion *plus faible* que les enfants ou les adultes normaux des mêmes groupes d'âge [17, 18, 19]. De même, pendant l'épidémie de Saint-Augustin, que nous avons précédemment étudiée, nous avons observé qu'il existe une relation entre la fréquence des anticorps anti-Lansing et la morbidité par la poliomyélite dans les divers groupes d'âges de cette population [20].

Dans le but de connaître la distribution normale des anticorps antipoliomyélitiques dans les divers groupes d'âge de la population de la province de Québec, nous avons prélevé 536 sérums



sur des habitants de la ville de Montréal, c'est-à-dire dans une région typiquement urbaine par excellence, et par comparaison 199 sérums chez des habitants du Comté de Roberval, dans une région purement rurale située à 230 milles au nord de Montréal, sur les bords du lac Saint-Jean.

Nous comparerons, enfin, les résultats obtenus à ceux de nos précédentes études sur la population de Saint-Augustin, dans le Nord Canadien.

#### TECHNIQUE.

1° LES SÉRUMS. — Les sérums que nous avons examinés ont eu pour origine :

a) 536 sérums de sujets normaux n'ayant jamais fait de poliomyélite paralytique, prélevés à Montréal en 1949, 1950 et 1951 ;

b) 199 sérums de sujets n'ayant jamais fait de poliomyélite paralytique, prélevés à Roberval en 1951.

Tous les sérums, recueillis stérilement, ont été conservés à 4°C jusqu'à leur emploi.

2° LE VIRUS. — Nous avons employé la souche de virus Lansing adaptée à la souris que MM. Th. Francis Jr. et G. C. Brown ont eu l'amabilité de nous expédier d'Ann-Arbour. Cette souche, dont la LD<sub>50</sub> est de 10<sup>-2,5</sup>, tue 90 p. 100 des souris à la dilution 1 : 10.

La préparation du virus, la technique de neutralisation et l'appréciation du degré de positivité ont été les mêmes que dans les travaux précédemment rapportés [20, 21].

Rappelons seulement que des mélanges à parties égales de virus dilué à 1 : 10 et des sérums à essayer dilués à 1 : 2,5, 1 : 10 et 1 : 40 donnant ainsi une neutralisation finale du virus à 1 : 20 par des dilutions de sérum à 1 : 5, 1 : 20 et 1 : 80 sont inoculés à des groupes de 8 souris par dilution qui restent en observation pendant trente jours.

Les résultats sont calculés suivant la méthode cumulative de Reed et Muench [22], et seuls les sérums donnant une protection cumulative de plus de 50 p. 100 sont considérés comme positifs ; ceux qui, positifs à 1 : 5, donnent moins de 30 p. 100 de protection à 1 : 80, sont qualifiés de *faiblement positifs* ; ceux qui, positifs à 1 : 5, donnent au 1 : 80 plus de 30 p. 100 de protection sont considérés comme *fortement positifs*.

Tous les tests présentant une irrégularité quelconque sont répétés. Si parmi les 8 souris témoins inoculées avec le virus seul, il y a plus d'une survie, toute l'expérience est recommencée.

#### RÉSULTATS.

1° SÉRUMS DE MONTRÉAL. — Sur 72 enfants âgés de 15 jours à 4 mois, nous n'en avons trouvé que 14 (19 p. 100) ne possédant pas dans leur sang d'anticorps neutralisant la souche Lansing ; 27 enfants (38 p. 100) les possèdent en quantité assez faible et 31 (43 p. 100) en quantité élevée. Sur 13 enfants âgés de 5 à 8 mois

nous n'avons trouvé que 3 sérums (23 p. 100) fortement positifs, 4 (31 p. 100) faiblement positifs et 6 (46 p. 100) négatifs.

Chez 15 enfants âgés de 1 an, nous avons trouvé 5 (31 p. 100)

TABLEAU I.

Distribution des anticorps anti-Lansing dans divers groupes de population de la province de Québec.

A G E	Montréal				Roberval				St-Augustin			
	Nombre	Pourcentage			Nombre	Pourcentage			Nombre	Pourcentage		
		0	+	++		0	+	++		0	+	++
0-6 mois	85	24	36	40	-	-	-	-	-	-	-	-
1-4 ans	88	40	8	52	34	29	21	50	40	60	27	12
5-9 ans	89	28	14	58	30	6	14	80	66	41	44	15
10-14 ans	73	16	22	62	43	12	9	79	51	8	16	76
15-19 ans	27	7	19	74	30	10	10	80	39	0	5	95
20-24 ans	35	20	23	57	16	6	19	75	27	0	19	81
25-29 ans	31	6	23	71	8	12	12	76	22	0	41	59
30-39 ans	32	6	16	78	27	6	12	82	27	7	11	82
40-49 ans	30	7	33	60	11	10	33	57	35	0	11	88
50-59 ans	27	11	19	70	-	-	-	-	17	0	41	59
60-78 ans	19	11	26	63	-	-	-	-	9	0	33	66
TOTAL	536				199				333			

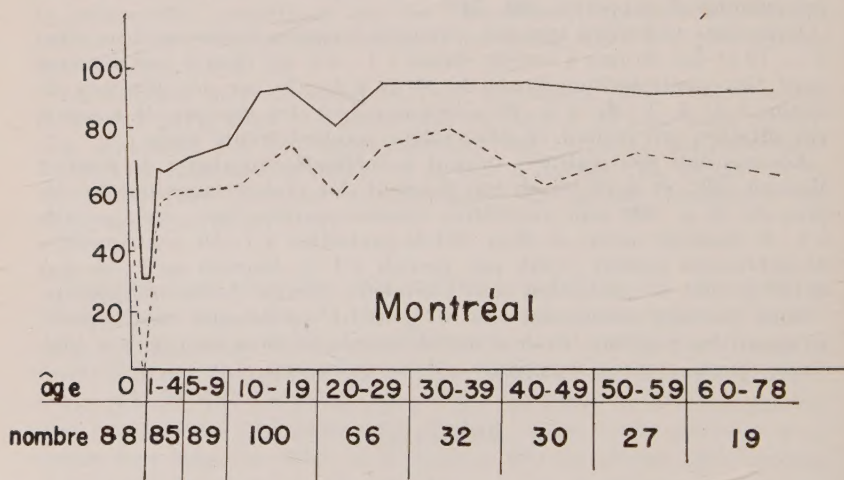


FIG. 1. — Distribution des anticorps neutralisant la souche Lansing chez les habitants de Montréal.

*Ligne ponctuée* : pourcentage des sujets normaux possédant un sérum fortement positif (sérums ++). *Trait continu* : pourcentage positif total de la population (sérums + et ++).

sérums fortement positifs et 11 (69 p. 100) négatifs. A l'âge de 2 ans, nous avons trouvé 10 sérums sur 18 (55 p. 100) fortement positifs, 2 (11 p. 100) faiblement positifs et 6 (33 p. 100) négatifs. Le pourcentage des sujets positifs à cette épreuve reste sensiblement le même jusqu'à l'âge de 7 ans, mais à partir de 8 ans, le pourcentage des sérums positifs augmente avec l'âge. Chez 44 enfants âgés de 11 à 15 ans, nous avons trouvé 67 p. 100 de sérums fortement positifs, 20 p. 100 de faiblement positifs, et 13 p. 100 de négatifs. La proportion maxima des positifs est atteinte chez les sujets âgés de 35 à 50 ans : sur 61 sérums de ce groupe nous avons trouvé 72 p. 100 de positifs, 23 p. 100 de faiblement positifs et 5 p. 100 seulement de négatifs (tableau I et fig. 1).

*Retenons-en qu'à Montréal, les anticorps anti-poliomyélitiques apparaissent surtout à partir de l'âge de 8 ans, et qu'ils augmentent progressivement pour atteindre leur maximum entre 15 et 30 ans.*

Notons ici enfin qu'à Montréal les jeunes filles paraissent acquérir les anticorps type Lansing un peu plus tard que les garçons (tableaux II et III). Parmi les fillettes âgées de 1 à 4 ans, nous avons

TABLEAU II

Distribution des anticorps anti-Lansing dans divers groupes de la population masculine de la province de Québec

A G E	Montréal				Roberval				St-Augustin			
	Nombre	Pourcentage			Nombre	Pourcentage			Nombre	Pourcentage		
		0	+	++		0	+	++		0	+	++
1-4 ans	54	39	11	50	20	35	30	35	20	50	30	20
5-9 ans	56	23	18	59	22	9	9	82	33	39	43	18
10-14 ans	34	12	29	59	41	10	10	80	26	4	19	77
15-19 ans	11	9	18	73	(2) )	19	14	67	21	0	5	95
20-29 ans	39	10	23	67	9)				25	0	16	84
30-49 ans	30	10	23	67	15	7	33	60	34	3	15	82
50-79 ans	28	11	21	68	.	.	.	.	17	0	53	47
TOTAL	252				119				176			

trouvé 43 p. 100 de négatifs, alors que parmi des garçons du même âge, nous trouvons seulement 39 p. 100 de négatifs. A partir de 15 ans, le pourcentage des sujets ne possédant pas d'anticorps est égal chez les hommes et chez les femmes. Cependant, chez les femmes âgées de 20 à 29 ans on note encore une proportion de négatifs plus grande que chez les hommes du même âge.



TABLEAU III

Distribution des anticorps anti-Lansing dans divers groupes de la population féminine de la province de Québec

A G E	Montréal				Roberval				St-Augustin			
	Nombre	Pourcentage			Nombre	Pourcentage			Nombre	Pourcentage		
		0	+	++		0	+	++		0	+	++
1-4 ans	28	43	3	54	14	21	7	71	20	70	25	5
5-9 ans	31	39	6	55	10	10	20	70	33	42	46	12
10-14 ans	39	21	15	64					25	12	12	76
15-19 ans	16	6	19	75	18	5	11	84	18	0	5	95
20-29 ans	27	15	26	59	15	0	14	86	24	0	42	58
30-49 ans	32	3	25	72	23	9	17	74	28	4	7	89
50-78 ans	18	11	22	66					9	0	11	89
TOTAL	191				80				157			

2° SÉRUM DE ROBERVAL. — Chez les habitants du Comté de Roberval, nous avons trouvé qu'à l'âge de 2 ans, 27 p. 100 des

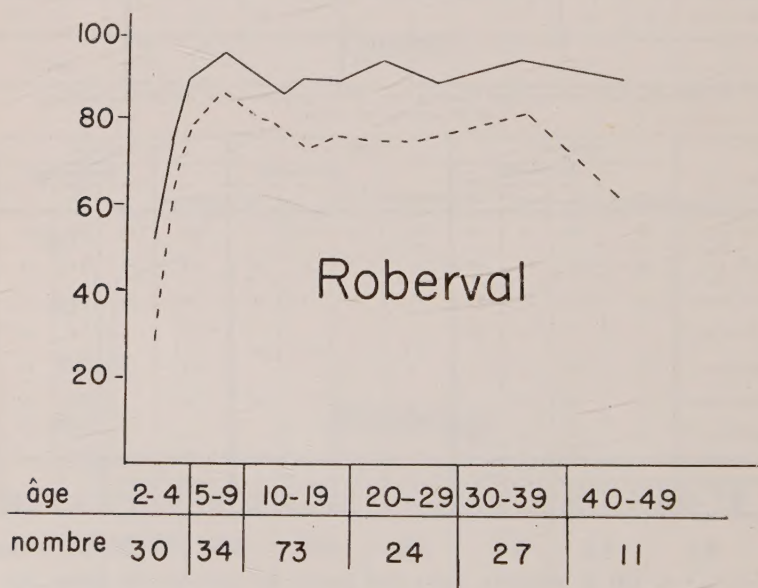


FIG. 2. — Distribution des anticorps neutralisant la souche Lansing chez les habitants du comté de Roberval (province de Québec).  
 Ligne ponctuée : pourcentage de la population possédant un sérum fortement positif. Trait continu : pourcentage positif total de la population (sérum + et ++).

enfants possèdent des sérums fortement positifs (3 sur 11), 27 p. 100 également ont des sérums faiblement positifs, et 46 p. 100 (5 sur 11) ne possèdent pas d'anticorps anti-Lansing. Le nombre des positifs augmente rapidement avec l'âge, et sur 23 sérums étudiés, provenant d'enfants âgés de 3 à 4 ans, nous avons trouvé 14 sérums (61 p. 100) fortement positifs, 4 (17 p. 100) faiblement positifs et 5 (22 p. 100) négatifs. Chez 16 enfants âgés de 5 à 7 ans, nous avons trouvé 81 p. 100 des sérums fortement positifs, 13 p. 100 de faiblement positifs et 6 p. 100 de négatifs. Ces chiffres sont très voisins de ceux trouvés chez 149 habitants du Comté de Roberval âgés de 8 à 48 ans : chez ces derniers, nous avons trouvé 76 p. 100 de sérums fortement positifs, 15 p. 100 de faiblement positifs et 9 p. 100 de négatifs (voir tableau I, fig. 2).

*Il en résulte qu'à l'âge de 8 ans, les habitants du Comté de Roberval ont pratiquement atteint le niveau d'immunité anti-polio-myélitique des adultes.*

Etant donné que le nombre des sérums étudiés en provenance de Roberval n'est pas grand, il est difficile de comparer valablement comme à Montréal les taux dans les deux sexes. Mais il semble que ce soit comme nous l'avons déjà observé ailleurs [21], le sexe féminin qui possède plus d'anticorps à tous les âges que le sexe masculin : sur 20 sérums de garçons âgés de 1 à 4 ans, nous avons trouvé 35 p. 100 de fortement positifs, 30 p. 100 de faiblement positifs et 35 p. 100 de négatifs ; chez les 14 filles du même âge, nous avons trouvé 71 p. 100 des sérums fortement positifs, 7 p. 100 faiblement positifs et 21 p. 100 négatifs. Chez 99 sujets mâles âgés de 5 à 48 ans, il y en a 74 p. 100 fortement positifs et 11 p. 100 négatifs, tandis que chez 66 femmes du même âge nous avons trouvé 79 p. 100 des sérums fortement positifs, 15 p. 100 faiblement positifs et 6 p. 100 négatifs (voir tableaux II et III).

#### DISCUSSION.

1° LES ANTICORPS DES SUJETS NORMAUX. — Au cours des années 1949 à 1951, nous avons eu l'occasion d'étudier les anticorps neutralisant la souche Lansing dans trois groupes de population de la Province de Québec. Le *premier groupe* comprend les habitants de la région de Montréal, population purement urbaine, le *deuxième groupe*, le Comté de Roberval, soit une région strictement rurale, et le *troisième groupe* est formé par les habitants du village isolé de Saint-Augustin, situé au nord sur la frontière du Labrador [20].

En comparant les résultats de ces trois groupes, on voit qu'à Saint-Augustin, c'est parmi les enfants âgés de 1 à 4 ans que l'on trouve le plus grand nombre de sujets négatifs. Le pourcentage de négatifs trouvé chez les enfants de Saint-Augustin âgés de 5 à 9 ans est égal à celui des enfants de Montréal âgés de 1 à 4 ans :



par contre, chez les enfants de Roberval âgés de 1 à 4 ans, on trouve le même pourcentage de négatifs que chez les enfants de Montréal âgés de 5 à 9 ans.

*Si l'on compare les pourcentages des sujets négatifs qui représentent en principe les sujets sensibles à l'infection, on voit que le taux minimum des sérums négatifs est atteint à 5 ans à Roberval, à 11 ans à Saint-Augustin, à partir de 15 ans à Montréal.*

Ces observations indiquent que les enfants d'une localité rurale (comté de Roberval) acquièrent les anticorps du type Lansing à un âge plus jeune que ceux des populations citadines ; par contre, le plus faible pourcentage des enfants positifs se rencontre à Saint-Augustin, c'est-à-dire dans une localité très isolée des autres groupes de population.

Parmi les adultes, au contraire, nous avons trouvé que ce sont les habitants de Saint-Augustin qui possèdent la plus grande proportion de sujets positifs, alors que les habitants de Roberval n'en ont qu'un peu plus que ceux de Montréal.

	NOMBRE	AGE	POURCENTAGE DES SÉRUMS :		
			0	+	++
Saint-Augustin . .	244	11 à 75 ans.	4	17,5	81,5
Roberval . . . . .	149	8 à 48 ans.	9	5	76
Montréal . . . . .	224	13 à 78 ans.	10	23	67

De nombreux travaux résultant des enquêtes effectuées dans les régions arctiques [10, 11, 13, 14, 15, 16] ou tropicales [3, 4] comme dans les pays de climat tempéré [5, 6, 9] montrant que le nombre de cas de paralysie infantile est en relation inverse de la proportion des sujets possédant des anticorps du type Lansing dans leur sang, nous avons voulu comparer la morbidité par poliomyélite dans les divers groupes d'âge de la population avec la courbe de distribution des anticorps établie par nos recherches.

Disons tout de suite que dans les trois groupes d'habitants de la Province de Québec, qui possèdent des taux différents d'anticorps anti-Lansing, on observe corrélativement une morbidité différente par la poliomyélite [23, 24].

2° LA MORBIDITÉ PAR POLIOMYÉLITE. — *Saint-Augustin.* — De tous les sujets que nous avons examinés, ce sont les adultes de Saint-Augustin qui possèdent la plus grande proportion de sujets positifs : pendant l'épidémie d'hiver de 1950, on n'a observé aucun cas de poliomyélite chez les habitants âgés de 14 ans et

plus. Rappelons que pourtant cette épidémie a été l'une parmi les plus graves qui aient ravagé la race blanche, car le taux de morbidité y a été de 8 000 cas pour 100 000 habitants. Mais, seuls les

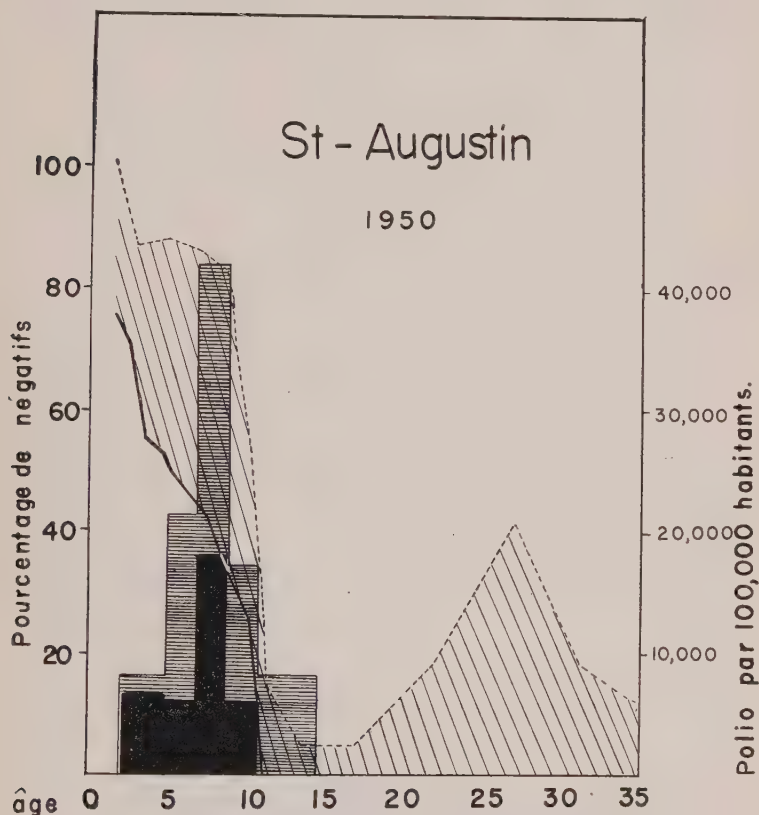


FIG. 3. — Comparaison du taux des anticorps anti-Lansing avec l'incidence de la poliomyélite pendant l'épidémie de 1950 à Saint-Augustin.

La ligne continue représente le pourcentage des habitants ne possédant pas d'anticorps anti-Lansing. La surface hachurée oblique représente le pourcentage de population possédant une faible quantité d'anticorps. La surface noire représente le nombre des cas de poliomyélite paralytique rapportés au taux de 100 000 habitants. La surface hachurée horizontale représente le nombre des cas de poliomyélite non paralytique rapportés au taux de 100 000 habitants.

enfants de 2 à 14 ans ont été frappés, la majorité des malades ayant de 4 à 12 ans. Pour ce dernier groupe d'âge, la morbidité a été de 23 100 cas pour 100 000 habitants.

Le test de neutralisation a montré que les tout jeunes enfants de

Saint-Augustin ne possèdent pas d'anticorps anti-Lansing ou n'en possèdent qu'en très faible quantité. Chez les enfants âgés de 11 à 14 ans qui possèdent des anticorps en forte quantité, on n'a observé que quelques cas de poliomyélite non paralytique (fig. 3). La différence de taux des sujets positifs entre les enfants âgés de 11 ans et plus et ceux de moins de 11 ans, de même que la différence de morbidité entre ces deux groupes peut être expliquée par l'hypothèse suivant laquelle il y aurait eu à Saint-Augustin, onze ans avant l'épidémie de 1950, une épidémie inapparente de poliomyélite non paralytique due à un virus fortement immunisant. La différence entre les deux groupes (ceux de plus et ceux de moins de 11 ans) est, en effet, trop tranchée pour résulter uniquement des différences individuelles des sujets normaux.

*Roberval.* — Chez les enfants de Roberval, nous avons trouvé une grande proportion de sujets positifs, plus grande que chez les enfants de Saint-Augustin et de Montréal. Or, dans cette région, la poliomyélite est extrêmement rare. Pour évaluer la morbidité, nous avons dû grouper les comtés Chicoutimi-Nord, Chicoutimi-Sud, Lac Saint-Jean et Roberval. Dans ces quatre comtés, situés au Sud du Lac Saint-Jean, il y a 150 000 habitants. La morbidité, pendant les années qui ont été épidémiques à Montréal a été : en 1946, 4 cas de poliomyélite pour 100 000 ; en 1949, 2 pour 100 000. En 1950 et 1951, qui n'étaient pas des années épidémiques, nous trouvons une morbidité de 0 à 0,6 pour 100 000 habitants (tableau IV). La poliomyélite-infection y est donc très

TABLEAU IV

Nombre de cas de poliomyélite par 100,000 habitants

	Montréal	Roberval, Lac St-Jean, et Chicoutimi	St-Augustin
1946	69.4	4	0
1949	22.3	2	0
1950	2.8	0.6	8,000
1951	8.4	0	0

répandue, comme le montre le taux des anticorps, et protège précocement les enfants contre la poliomyélite-maladie.

*Montréal.* — Si nous comparons le taux des anticorps dans les divers groupes d'âge de la population de Montréal avec la morbidité par poliomyélite pendant les années épidémiques, nous observons de même un parallélisme évident entre la morbidité et l'absence d'anticorps dans les groupes considérés.

Pendant l'épidémie de 1946, bien décrite par le Dr Groulx dans son rapport du Service de Santé de Montréal [23], nous trouvons que le nombre maximum des malades se trouve dans les âges de 1 à 9 ans ; c'est aussi le groupe qui possède le moins d'anticorps anti-Lansing (fig. 4).

Rappelons, cependant, que nos études précédentes [20, 21] ont

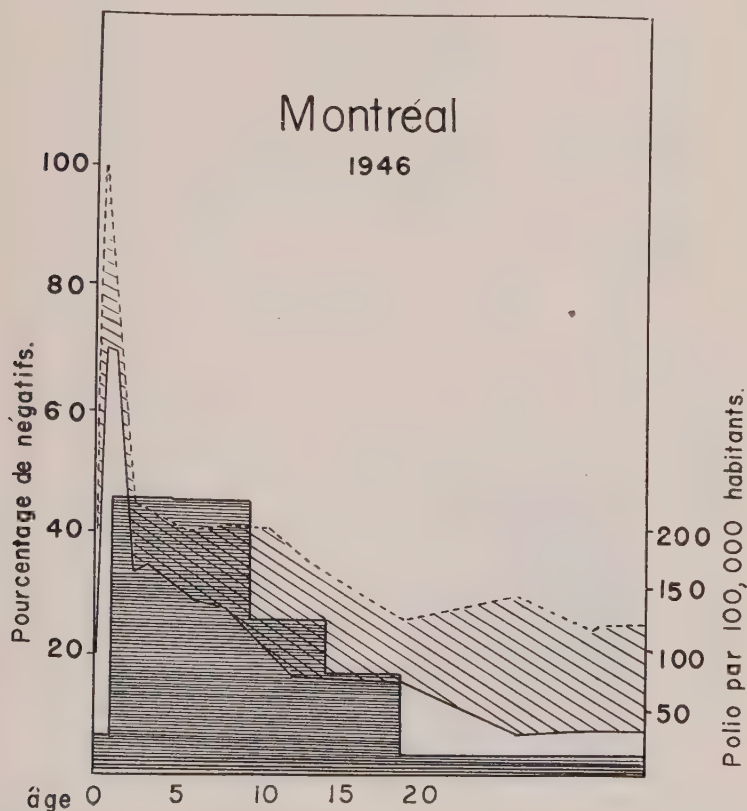


FIG. 4. — Comparaison du taux des anticorps anti-Lansing de la population avec l'incidence de la poliomyélite pendant l'année 1946 à Montréal.

La *ligne continue* représente le pourcentage de population ne possédant pas d'anticorps. La *surface hachurée oblique* représente le pourcentage de population possédant une faible quantité d'anticorps. La *surface hachurée horizontale* représente le nombre de cas de poliomyélite paralytique et non paralytique pendant l'épidémie de 1946 rapportés au taux de 100 000 habitants.

montré que, selon toute apparence, le virus causal des épidémies montréalaises de 1946 et 1949 *n'était pas* un virus Lansing.

La deuxième épidémie, en 1949 (fig. 5), nous montre une distri-

bution des malades dans les divers groupes d'âge assez semblable à celle de 1946. Le plus grand nombre des malades ont été âgés de 1 à 9 ans, et il y a eu très peu de malades âgés de 20 ans ou plus. Ces deux épidémies de 1946 et 1949 ont été assez sévères.

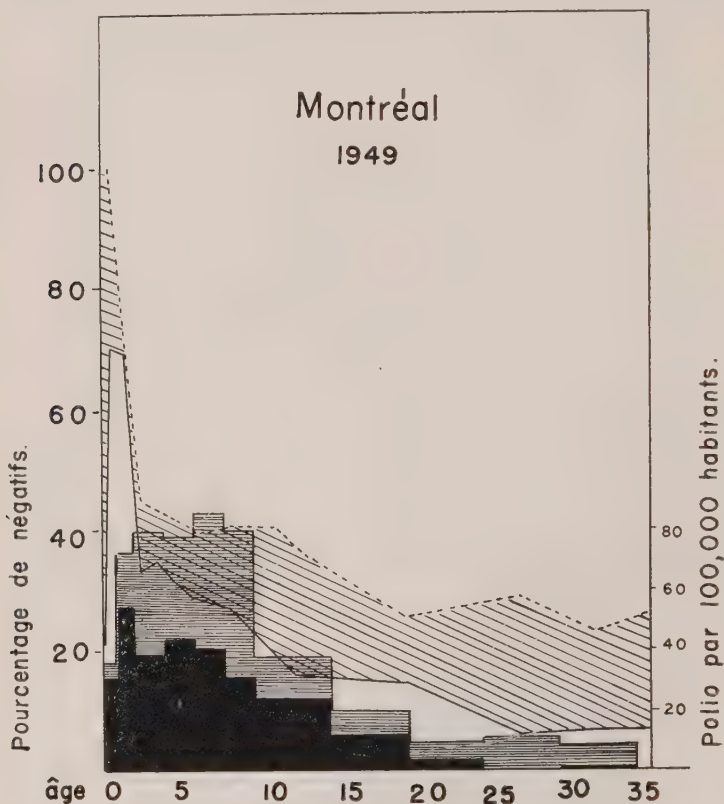


FIG. 5. — Comparaison du taux des anticorps anti-Lansing avec l'incidence de la poliomyélite pendant l'année 1949 à Montréal.

N. B. — Pour les figures 5 à 10 : la *ligne continue* représente le pourcentage des habitants ne possédant pas d'anticorps anti-Lansing. La *surface couverte de hachures obliques* représente le pourcentage de population possédant une faible quantité d'anticorps. La *surface noire* représente le nombre de cas de poliomyélite paralytique rapportés à 100 000 habitants et la *surface couverte avec des lignes horizontales*, le nombre de cas de poliomyélite non paralytique rapportés à 100 000 habitants.

Pendant l'épidémie de 1945-1946, il a été relevé 69,4 cas par 100 000 habitants et pendant celle de 1949, la morbidité a été de 22,3 par 100 000 habitants.

L'épidémie de 1951 a été assez bénigne : la morbidité y a été de 8,4 cas par 100 000 habitants. En 1951 aussi, la plus grande morbidité est relevée parmi les enfants âgés de 1 an à 9 ans (fig. 6). L'épidémie de 1951 diffère cependant des deux précédentes en ce que la morbidité chez les enfants âgés de 1 à 3 ans (nés, par consé-

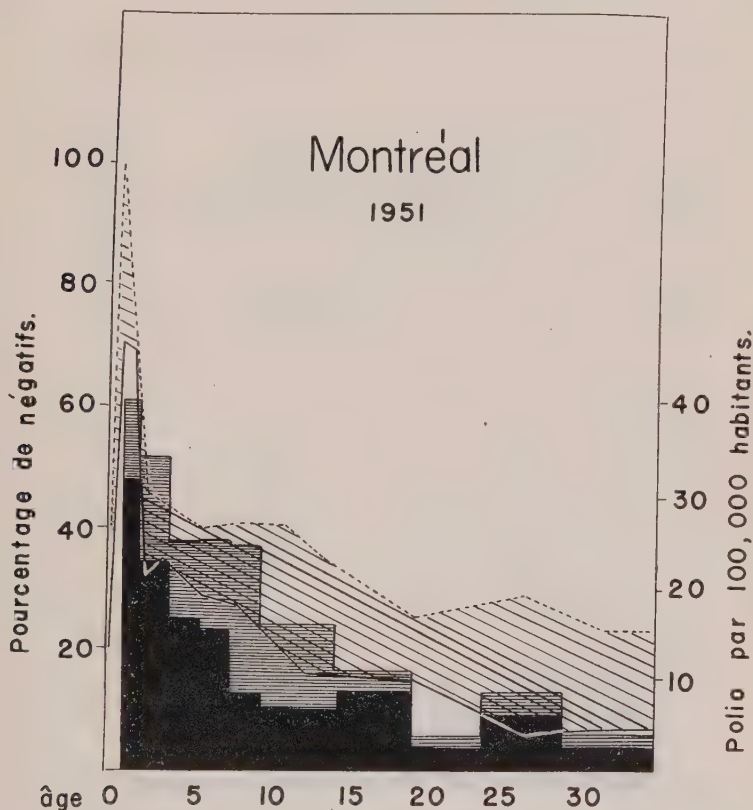


FIG. 6. — Comparaison du taux des anticorps anti-Lansing avec l'incidence de la poliomyélite pendant l'année 1951 à Montréal. (Même légende que pour la figure 5.)

quent, depuis 1946) a été plus grande que chez les enfants de 4 à 9 ans. Pendant les épidémies de 1945-1946 et de 1949, la morbidité des enfants âgés de 1 à 3 ans a été sensiblement la même, ou un peu plus faible, que chez les enfants âgés de 4 à 9 ans.

Les figures 3, 5 et 6 montrent que la proportion des sujets paralysés dans les divers groupes d'âge suit la courbe représentant le pourcentage des sujets ne possédant pas d'anticorps, et que la



courbe de morbidité de la poliomyélite est parallèle à la courbe représentant le pourcentage de population ne possédant pas d'anticorps ou en possédant en faible quantité.

Si l'on considère les courbes de neutralisation de la souche Lansing et de morbidité de poliomyélite pour les femmes et pour les hommes

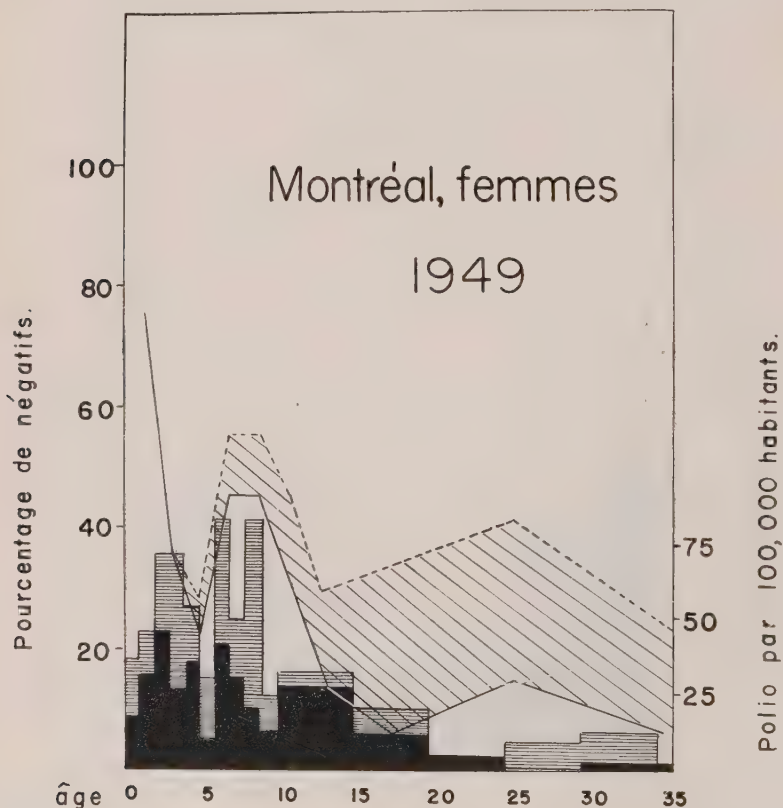


Fig. 7. — Comparaison du taux des anticorps anti-Lansing avec l'incidence de la poliomyélite dans la population féminine pendant l'année 1949 à Montréal. (Légende figure 5.)

séparément, on trouve que cette relation est très frappante. Ainsi, nous avons trouvé que les filles de Montréal âgées de 3 à 5 ans possèdent *plus d'anticorps* que celles âgées de 6 à 9 ans. D'autre part, nous constatons que la morbidité par poliomyélite pendant l'épidémie de 1949 a été plus faible chez les filles âgées de 4 à 5 ans que chez celles âgées de 6 à 8 ans (fig. 7 et 8). Chez les garçons (fig. 9 et 10), on trouve que les garçons âgés de 6 à 7 ans possèdent moins d'anticorps que ceux plus



jeunes ou plus âgés ; c'est dans le même groupe (6 à 7) que l'on trouve aussi la plus grande morbidité.

Tous nos résultats démontrent que la poliomyélite est rare dans les groupes de population de la Province de Québec dont une

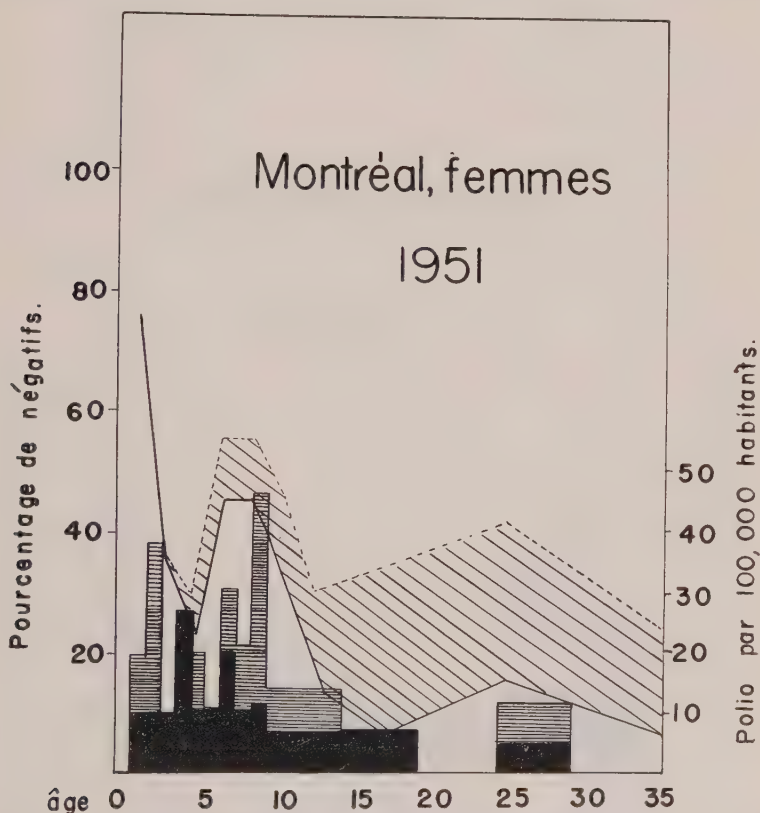


FIG. 8. — Comparaison du taux des anticorps anti-Lansing avec l'incidence de la poliomyélite dans la population féminine pendant l'année 1951. (Légende figure 5.)

grande proportion possède des anticorps anti-Lansing, comme c'est le cas des habitants de tous âges de la région du Lac Saint-Jean (Roberval), et comme c'est le cas pour les adultes seulement à Saint-Augustin. Ils montrent aussi que, dans une même population, la résistance à la poliomyélite augmente (ou la susceptibilité diminue) au fur et à mesure que le taux des anticorps augmente dans les divers groupes d'âge.

Il paraît ainsi très probable que durant les années inter-épidémiques les virus poliomyélitiques, ceux du type Lansing comme ceux des autres types, sont répandus à l'état latent dans la population. Les groupes qui vivent dans les conditions d'hygiène favorables à la dissémination du virus de la poliomyélite s'immunisent

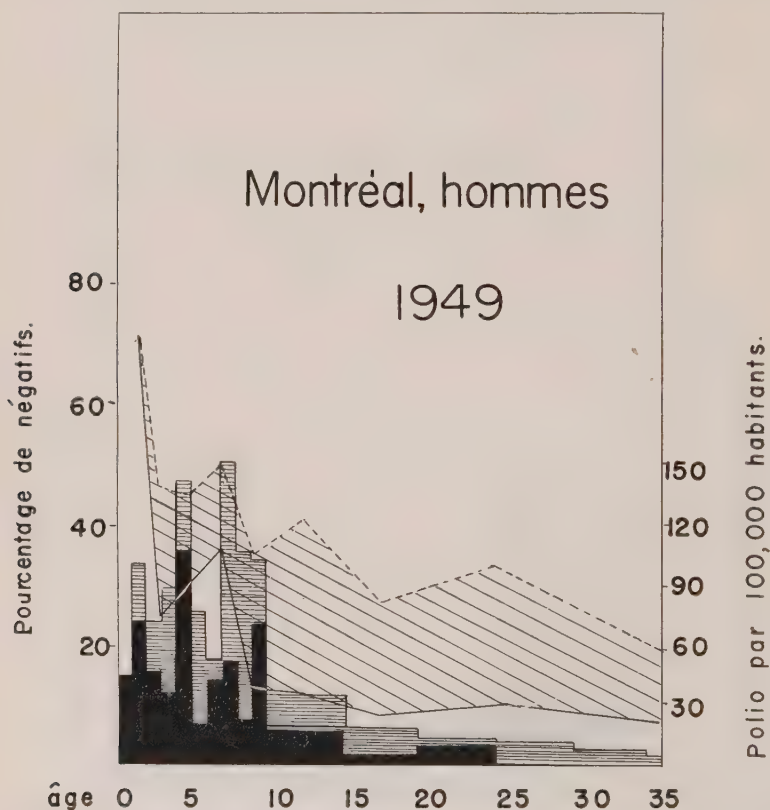


FIG. 9. — Comparaison du taux des anticorps anti-Lansing avec l'incidence de la poliomyélite dans la population masculine pendant l'année 1949. (Légende figure 5.)

à la faveur d'infections inapparentes contractées par la rencontre répétée de petites doses de virus qui déterminent à la longue l'apparition des anticorps antipoliomyélitiques et la résistance à la paralysie infantile. Lorsque cette infection latente manque, il n'y a pas d'immunisation : c'est le cas des enfants de moins de 11 ans, à Saint-Augustin. Pour connaître complètement l'état d'immunité d'une population donnée, il faudrait pouvoir mesurer

le taux des anticorps contre chacun des trois types immunologiques principaux du virus poliomyélitique.

Comme nous l'avons vu, les anticorps que nous avons recherchés sont ceux du groupe immunologique II (Lansing), alors que les virus en cause dans les épidémies considérées ne paraissent pas

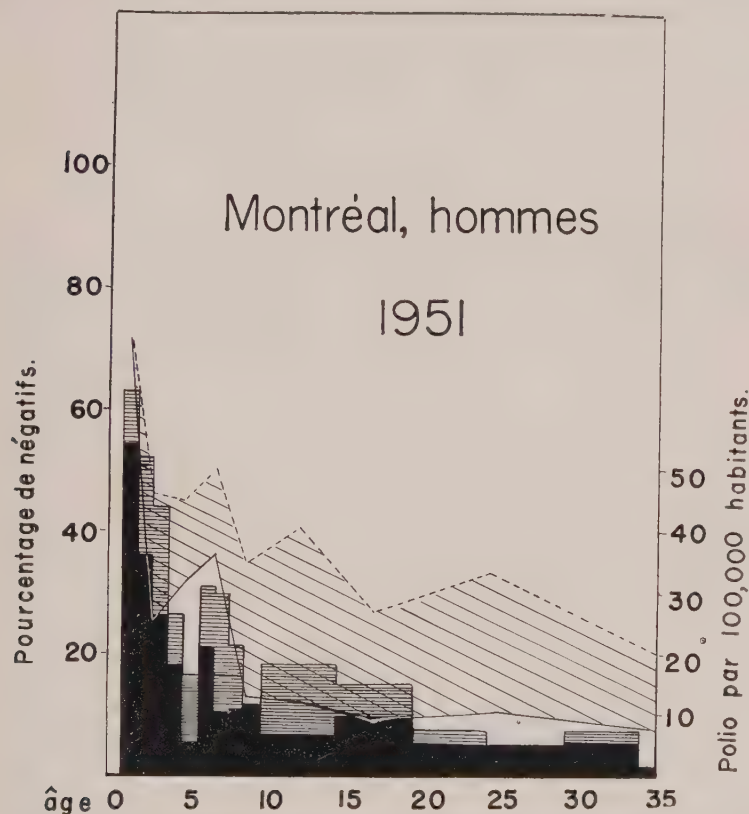


FIG. 10. — Comparaison du taux des anticorps anti-Lansing avec l'incidence de la poliomyélite dans la population masculine pendant l'année 1951. (Légende figure 5.)

appartenir à ce groupe. Les virus I et III sont-ils aussi répandus que les virus du groupe II, ou l'infection latente par l'un des types de virus fait-elle apparaître des anticorps pour les autres types antigéniques ? Ce point ne pourra être élucidé que par de nouvelles recherches. Il est, en tout cas, acquis que *la mesure du taux des anticorps anti-Lansing dans une population peut donner une image exacte de son état de réceptivité vis-à-vis de l'infection poliomyélitique en général.*

## CONCLUSIONS ET RÉSUMÉ.

Les présentes recherches ont porté sur la recherche des anticorps anti-Lansing chez 735 sujets normaux, soit 536 habitants de Montréal (population urbaine) et 199 habitants de Roberval (population rurale). Les résultats en sont comparés à ceux d'une enquête antérieure ayant porté sur 396 habitants de Saint-Augustin (localité isolée du Grand Nord Canadien). Les points suivants ressortent de nos constatations :

1° A *Montréal*. — a) 23 p. 100 des enfants âgés de 15 jours à 4 mois ne possèdent pas d'anticorps anti-Lansing dans leur sang et 33 p. 100 ont un niveau élevé d'anticorps ;

b) 69 p. 100 des enfants âgés d'un an sont négatifs et 31 p. 100 très positifs ;

c) A 2 ans, on trouve 33 p. 100 de négatifs, 11 p. 100 de faiblement positifs et 55 p. 100 de fortement positifs ;

d) Chez les adultes, la proportion est de 5 p. 100 de négatifs, 23 p. 100 de faiblement positifs et 72 p. 100 de fortement positifs.

2° A *Roberval*. — a) Chez les enfants âgés de 2 ans, nous trouvons : 46 p. 100 de négatifs, 27 p. 100 de faiblement positifs et 27 p. 100 de positifs ;

b) A partir de 3 ans, on rencontre 22 p. 100 de négatifs, 17 p. 100 de faiblement positifs et 61 p. 100 de fortement positifs ;

c) Chez les adultes, la proportion est de 9 p. 100 de négatifs, 15 p. 100 de faiblement positifs et 76 p. 100 de fortement positifs.

3° En comparant trois régions de la province de Québec : Montréal (région urbaine), Roberval (région rurale) et Saint-Augustin (région du Nord, éloignée et très isolée), nous observons que les groupes de population ne possédant pas d'anticorps anti-Lansing sont plus susceptibles à la poliomyélite paralytique que ceux possédant des anticorps anti-Lansing en grande proportion.

4° La morbidité par poliomyélite paralytique est en raison inverse du pourcentage des sujets négatifs dans chaque groupe d'âge et pour chaque catégorie de population considérée.

5° La recherche des anticorps anti-Lansing est ainsi un bon témoin de l'état de réceptivité d'une population au virus poliomyélitique.

6° Dans la Province de Québec, que caractérise son homogénéité ethnique, la susceptibilité à la poliomyélite apparaît liée aux conditions hygiéniques et sociales de vie, les groupes de population rurale et citadine ayant, en même temps que des modes d'existence, des taux de morbidité par poliomyélite et des niveaux d'anticorps différents. Dans un groupe de même race, mais vivant d'une existence isolée (Saint-Augustin), les conditions d'hygiène sont celles de la vie rurale, avec l'immunisation spontanée des

habitants qu'elle comporte lorsque le virus est présent (population âgée de plus de 11 ans); mais l'isolement supprimant les occasions de réinfection (population en-dessous de 11 ans), on voit manquer la protection naturelle et se manifester une réceptivité au virus très élevée parmi les éléments non protégés de la population.

7° L'infection spontanée inapparente apparaît ainsi comme le facteur majeur dans l'immunisation des individus et la résistance acquise des populations à la poliomyélite.

★ ★

Nous exprimons nos remerciements au D<sup>r</sup> A.-R. Foley, épidémiologiste de la Province de Québec, au D<sup>r</sup> G. Charest, surintendant de la division des maladies contagieuses de la ville de Montréal, pour les renseignements épidémiologiques, et au D<sup>r</sup> A. Valois, démographe du Service de Santé de la Ville de Montréal, pour les renseignements démographiques qu'ils nous ont obligeamment fournis.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] N. P. HUDSON et E. H. LENNETTE. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1932, **29**, 1090.
- [2] P. K. OLITSKY et G. M. FINDLAY. *J. Bact.*, 1946, **52**, 255.
- [3] J. H. S. GEAR. *Proceed. Intern. Congress Trop. Med. a. Malaria*, 1948, **1**, 555; id., *Poliomyelitis. Papers a. Discussions presented at the First International Poliomyelitis Conference*, 1949, p. 50.
- [4] W. McD. HAMMON, G. S. GATHER et N. HOLLINGER. *Am. J. Publ. Health*, 1950, **40**, 293.
- [5] A. B. SABIN. *Am. J. Publ. Health*, 1951, **41**, 1215.
- [6] T. B. TURNER, D. H. HOLLANDER, S. BUCKLEY, U. P. KOKKO et C. P. WINDSOR. *Am. J. Hyg.*, 1950, **52**, 323.
- [7] S. D. COLLINS. *Publ. Health Rep.*, 1946, **61**, 327.
- [8] R. K. C. LEE. *Publ. Health Rep.*, 1941, **56**, 1556.
- [9] A. B. SABIN. *Poliomyelitis. Papers and Discussions presented at the First International Poliomyelitis Conference*, 1949, p. 3.
- [10] J. R. PAUL et J. T. RIORDAN. *Am. J. Hyg.*, 1950, **52**, 202.
- [11] J. R. PAUL, J. T. RIORDAN et J. L. MELNICK. *Am. J. Hyg.*, 1951, **54**, 275.
- [12] E. M. CLARK et A. J. RHODES. *Canad. J. Med. Sci.*, 1951, **29**, 216.
- [13] J. D. ADAMSON, J. P. MODDY, A. F. W. PEART, R. A. SMILLIE et J. C. WILT. *Canad. med. Assoc. J.*, 1949, **61**, 339.
- [14] A. F. W. PEART. *Canad. J. Publ. Health*, 1949, **40**, 405.
- [15] A. J. RHODES, E. M. CLARK, A. GOODFELLOW et W. L. DONOHUE. *Canad. J. Publ. Health*, 1949, **40**, 418.
- [16] K. HROLV. *Canad. Publ. Health J.*, 1935, **26**, 575.
- [17] B. F. HOWITT. *J. infect. Dis.*, 1932, **51**, 565.
- [18] P. H. HARMON et H. N. HARKINS. *J. Am. Med. Assoc.*, 1936, **107**, 552.
- [19] G. C. BROWN et T. FRANCIS Jr. *J. Immunol.*, 1947, **57**, 1.

- [20] V. PAVILANIS et A. FRAPPIER. Ces *Annales*, 1951, **81**, 583.
- [21] V. PAVILANIS et P. LÉPINE. Ces *Annales*, 1952, **82**, 145.
- [22] L. J. REED et H. MUENCH. *Am. J. Hyg.*, 1938, **27**, 493.
- [23] A. GROULX. *Rapport annuel du Service de Santé de Montréal pour l'année 1946*, p. 61.
- [24] G. CHAREST. *Rapport annuel du Service de Santé de Montréal pour l'année 1949*.



## LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES A L'INSTITUT PASTEUR EN 1951

par R. BÉQUIGNON et C. VIALAT.

Ce rapport, établi suivant le plan fixé par la Conférence internationale de la Rage, concerne l'année 1951.

### 1° *Personnes traitées.*

262 personnes se sont présentées à la consultation du service des vaccinations antirabiques. A 96 le traitement a été conseillé.

### 2° *Méthode de traitement.*

La méthode employée est la méthode Pasteurienne.

Les moelles sont soumises à la dessiccation, en chambre noire à 22°, dans des flacons munis de deux tubulures fermées par de l'ouate ordinaire et dont le fond est garni de potasse caustique. Après deux, trois ou quatre jours de dessiccation, les moelles sont introduites dans des pots-bans contenant 20 cm<sup>3</sup> de glycérine neutre à 30° Baumé et stérilisés à l'autoclave à 120°.

Ce procédé de conservation des moelles en glycérine, proposé par E. Roux en 1887 [1] et introduit dans la pratique par A. Calmette en 1891, est adopté, depuis 1911, à l'Institut Pasteur.

Les moelles ainsi traitées sont conservées à la glacière à +3°.

Elles ne sont plus utilisées pour la vaccination lorsqu'elles ont séjourné dix à douze jours en glycérine.

Chaque jour, les sujets en traitement reçoivent 4 à 5 mm. de moelle desséchée et triturée dans 3 cm<sup>3</sup> d'eau distillée stérile. Le traitement a une durée de quinze, dix-huit, vingt et un ou vingt-cinq jours, suivant la gravité des morsures.

\*  
\* \*

Le virus fixe actuellement utilisé représentait, le 31 décembre 1951, le 1884° passage de la souche isolée par Pasteur le 19 novembre 1882 et employée pour la vaccination, à partir du 90° passage, lors de la création du service de vaccination antirabique rue d'Ulm.

Afin d'éviter l'infection possible des moelles, celles-ci sont



extraites avant la mort des animaux, qui sont saignés dès que la paralysie est complète.

Le procédé d'extraction des moelles est celui décrit par Oshida.

★★

### Formule du traitement d'après l'âge des moelles.

1 <sup>er</sup> jour . . . . .	Moelle de 4 jours (3 cm <sup>3</sup> ).
2 <sup>e</sup> — . . . . .	— 4 — —
3 <sup>e</sup> — . . . . .	— 4 — —
4 <sup>e</sup> — . . . . .	— 4 — —
5 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
6 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
7 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
8 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
9 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
10 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
11 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
12 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
13 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
14 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
15 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
16 <sup>e</sup> jour . . . . .	Moelle de 3 jours (3 cm <sup>3</sup> ).
17 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
18 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
19 <sup>e</sup> jour . . . . .	Moelle de 2 jours (3 cm <sup>3</sup> ).
20 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
21 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
22 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
23 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
24 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
25 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —

### 3° Répartition des personnes traitées d'après le territoire sur lequel elles ont été mordues :

Afrique du Nord . . . . .	4
Afrique Équatoriale Française. . . . .	2
France. . . . .	88
Italie . . . . .	1
Madagascar. . . . .	1

### 4° Répartition des personnes traitées suivant l'animal mordeur.

Chiens de propriétaires connus . . . . .	30
Chiens errants . . . . .	54
Chats de propriétaires connus . . . . .	10
Chat errant . . . . .	1
Lapin en expérience. . . . .	1

### 5° Répartition des personnes traitées d'après les preuves de rage chez l'animal mordeur.

Catégorie A. — La rage de l'animal mordeur a été constatée

par le développement de la maladie chez des animaux inoculés avec le cerveau ou par un examen histologique.

*Catégorie B.* — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

*Catégorie C.* — L'animal mordeur est suspect de rage.

Catégorie A . . . . .	4
Catégorie B. . . . .	2
Catégorie C. . . . .	90

Nous avons eu à examiner deux cerveaux humains adressés l'un par M. le professeur Moreau de l'hôpital Cochin, l'autre par M. le D<sup>r</sup> Dézest de l'hôpital mixte de Yaoundé (Cameroun) : dans les deux cas le diagnostic clinique a été confirmé par l'examen histologique.

Les névraxes de 77 animaux ont été soumis à l'examen du service des vaccinations antirabiques. Quarante-huit fois les commémoratifs de la morsure de l'animal et l'examen histologique du système nerveux nous ont autorisés à arrêter le traitement chez les personnes mordues.

Les principes généraux qui ont dicté cette décision ont été rappelés dans un rapport précédent [2].

*6° Répartition des personnes traitées d'après les caractères de la morsure :*

Profondes . . . . .	56
Superficielles . . . . .	43

*7° Répartition des personnes traitées suivant que les vêtements ont été interposés ou non :*

Peau nue . . . . .	62
Vêtements interposés . . . . .	34

*8° Répartition des personnes traitées d'après le siège de la morsure (\*) :*

Tête. . . . .	40
Membres supérieurs. . . . .	53
Tronc. . . . .	3
Membres inférieurs . . . . .	30

*9° Répartition des personnes traitées d'après le nombre de jours écoulés entre la morsure et le traitement :*

0 à 4 jours. . . . .	51
5 à 7 jours. . . . .	30
8 à 14 jours. . . . .	10
15 à 21 jours . . . . .	5
Plus de 21 jours. . . . .	0

(\*) Quand il s'agit de morsures multiples, seul est indiqué le siège de la morsure la plus dangereuse.

10° *Autres renseignements :*

## Répartition des personnes traitées par départements :

Alpes-Maritimes . . . . .	1	Loiret . . . . .	2
Aube . . . . .	1	Lot . . . . .	1
Calvados . . . . .	1	Morbihan . . . . .	1
Charente-Maritime . . . . .	1	Moselle . . . . .	1
Creuse . . . . .	2	Pas-de-Calais . . . . .	1
Doubs . . . . .	1	Pyrénées (Basses) . . . . .	1
Eure . . . . .	1	Seine { Paris . . . . .	27
Eure-et-Loir . . . . .	1	Banlieue . . . . .	28
Gers . . . . .	1	Seine-et-Oise . . . . .	10
Ile-et-Vilaine . . . . .	1	Vienne (Haute) . . . . .	3
Indre . . . . .	1	Yonne . . . . .	1

★ ★  
★ ★

Le tableau ci-dessous indique les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine.

ANNÉES	PERSONNES traitées	CATÉGORIE A	CATÉGORIE B	CATÉGORIE C	DÉCÈS	MORTALITÉ p. 100
1886 . . . . .	2 671	231	1 926	514	25	0,94
1887 . . . . .	1 770	357	1 156	257	14	0,79
1888 . . . . .	1 622	402	972	255	9	0,55
1889 . . . . .	1 830	346	1 187	297	7	0,38
1890 . . . . .	1 540	416	900	215	5	0,32
1891 . . . . .	1 559	324	915	320	4	0,25
1892 . . . . .	1 790	128	1 062	600	4	0,22
1893 . . . . .	1 648	132	1 008	508	6	0,36
1894 . . . . .	1 384	166	798	423	7	0,50
1895 . . . . .	1 520	122	949	449	5	0,38
1896 . . . . .	1 308	106	747	455	4	0,30
1897 . . . . .	1 529	150	918	461	6	0,39
1898 . . . . .	1 465	141	855	469	3	0,20
1899 . . . . .	1 614	152	1 099	363	4	0,25
1900 . . . . .	1 420	179	866	375	4	0,28
1901 . . . . .	1 321	174	785	362	5	0,33
1902 . . . . .	1 105	150	625	330	2	0,18
1903 . . . . .	628	116	224	288	2	0,32
1904 . . . . .	755	148	330	277	3	0,39
1905 . . . . .	727	166	306	255	3	0,41
1906 . . . . .	772	173	396	203	1	0,13
1907 . . . . .	786	135	384	267	3	0,38
1908 . . . . .	524	113	269	142	1	0,19
1909 . . . . .	467	84	210	173	1	0,21
1910 . . . . .	401	98	143	160	0	0,00
1911 . . . . .	342	76	114	152	1	0,29
1912 . . . . .	395	71	145	179	0	0,00
1913 . . . . .	330	73	113	144	0	0,00
1914 . . . . .	373	68	102	203	0	0,00
1915 . . . . .	654	87	301	266	1	0,15
1916 . . . . .	1 388	188	658	542	3	0,21
1917 . . . . .	1 543	216	848	479	4	0,26
1918 . . . . .	1 803	206	885	712	3	0,16

ANNÉES	PERSONNES traitées	CATÉGORIE A	CATÉGORIE B	CATÉGORIE C	DÉCÈS	MORTALITÉ p. 100
1919 . . . . .	1 813	231	920	662	3	0,16
1920 . . . . .	1 126	86	554	486	6	0,53
1921 . . . . .	998	64	412	522	1	0,10
1922 . . . . .	754	101	353	300	0	0,00
1923 . . . . .	727	90	363	274	0	0,00
1924 . . . . .	764	135	208	421	1	0,14
1925 . . . . .	782	110	316	356	0	0,00
1926 . . . . .	634	74	246	314	0	0,00
1927 . . . . .	639	78	281	280	0	0,00
1928 . . . . .	671	76	203	387	0	0,00
1929 . . . . .	542	49	231	262	0	0,00
1930 . . . . .	589	77	116	396	0	0,00
1931 . . . . .	531	49	212	270	0	0,00
1932 . . . . .	561	64	271	226	0	0,00
1933 . . . . .	443	41	122	280	0	0,00
1934 . . . . .	496	23	51	422	0	0,00
1935 . . . . .	510	18	42	450	0	0,00
1936 . . . . .	463	13	20	430	0	0,00
1937 . . . . .	454	2	18	434	0	0,00
1938 . . . . .	411	3	11	397	0	0,00
1939 . . . . .	411	2	14	395	0	0,00
1940 . . . . .	449	0	8	441	0	0,00
1941 . . . . .	214	1	0	213	0	0,00
1942 . . . . .	149	0	1	148	0	0,00
1943 . . . . .	131	0	0	131	0	0,00
1944 . . . . .	122	0	1	121	0	0,00
1945 . . . . .	179	0	2	177	0	0,00
1946 . . . . .	228	1	1	226	0	0,00
1947 . . . . .	212	1	3	208	0	0,00
1948 . . . . .	150	1	1	148	0	0,00
1949 . . . . .	129	1	0	128	0	0,00
1950 . . . . .	105	0	6	99	0	0,00
1951 . . . . .	96	4	2	90	0	0,00
Total général.	55 470	7 089	27 199	21 182	151	0,27

★  
★ ★

Le service antirabique a, en outre, fabriqué en 1951 :

17 litres de vaccin antirabique phéniqué à usage humain et  
70 litres de vaccin à usage vétérinaire.

11° *Mesures prises en vue de suivre l'évolution des cas traités pendant six mois au maximum.*

Les médecins sont priés de nous tenir au courant des accidents qui pourraient se produire pendant les six mois qui suivent le traitement.

12° *Accidents paralytiques* : Néant.

13° *Décès* : Néant.

#### BIBLIOGRAPHIE

[1] ROUX (E.). *Ces Annales*, 1887, **1**, 87.

[2] BÉQUIGNON (R.) et VIALAT (Ch.). *Ces Annales*, 1943, **69**, 372.

# ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA CORTISONE ET DE L'ACTH SUR LA PRODUCTION DES ANTICORPS

par L. CARRÈRE et J. ROUX (\*).

(Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Médecine,  
Montpellier.)

Les travaux suscités par l'action de la cortisone et de l'ACTH sur la formation des anticorps sont nombreux, mais les résultats expérimentaux obtenus sont souvent très différents, même contradictoires.

Tandis que certains expérimentateurs estiment que l'ACTH et la cortisone augmentent la production d'anticorps, d'autres concluent, au contraire, à leur diminution, d'autres, enfin, ne décèlent aucune action. Dans quelques expériences, le traitement hormonal est institué après l'injection d'antigène, alors que les anticorps sont apparus; ailleurs les injections d'hormones et d'antigène sont concomitantes.

Chase, White et Dougherty, en 1946, injectant l'ACTH en même temps que l'antigène, voient une augmentation importante du taux des anticorps. L'ACTH employée ensuite sur l'animal déjà immunisé provoque une réaction anamnétique.

Dans les mêmes conditions d'expérience que les auteurs précédents, Eisen et ses collaborateurs, dosant les anticorps par méthode chimique, n'ont trouvé aucune action marquée de l'ACTH. Tout au plus signalent-ils une augmentation très fugitive des anticorps immédiatement après l'injection hormonale. De Vries, utilisant l'ACTH chez le lapin préalablement immunisé, ne voit aucune action. De même chez l'homme déjà immunisé contre l'hémolysine  $\alpha$  du staphylocoque, Herbert et de Vries ne signalent aucune action appréciable avec une dose unique massive de 40 à 400 mg d'ACTH.

Il en est tout autrement avec Germuth et Ottinger qui instituent chez des lapins un traitement hormonal en même temps qu'ils injectent l'antigène. Ce traitement dure dix-huit jours et

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 mars 1952.

les doses quotidiennes d'ACTH ou de cortisone sont de 10 mg par jour. Dans ces conditions, l'ACTH provoque une diminution du taux des anticorps d'environ 50 p. 100. La cortisone a une action plus grande, allant jusqu'à la disparition des anticorps. Fischel, Kabat et Lemay, utilisant une seule forte dose d'ACTH sur le lapin préalablement immunisé, concluent à une légère diminution du taux des anticorps circulants. Avec Stoerk et Bjorneboe, Fischel, injectant l'ACTH à dose quotidienne de 0,5 à 1 mg pendant vingt-huit jours, en même temps que l'antigène, conclut à une diminution du taux des anticorps d'environ 50 p. 100. Ils obtiennent les mêmes résultats avec la cortisone. Récemment, Halpern et ses collaborateurs ont étudié le rythme de recharge d'anticorps chez des lapins soumis à un traitement par cortisone ; celle-ci agit en augmentant le taux d'anticorps pendant les deux ou trois premiers jours, ensuite en abaissant très nettement ce taux.

Ce résumé de quelques travaux parmi les plus marquants permet de se rendre compte de l'importance des modalités de l'expérience.

L'antigène employé, l'état de pureté des produits utilisés, les doses, le moment d'injection de l'hormone par rapport à l'introduction de l'antigène sont autant de facteurs qui doivent contribuer à la diversité des résultats. Les problèmes du rôle hormonal dans la réponse d'un organisme aux antigènes sont loin d'être résolus. Il ne nous paraît donc pas inutile de rapporter nos essais.

#### EXPÉRIENCES PERSONNELLES.

I. a) Trois lots de 2 cobayes, du poids moyen de 450 g, reçoivent en injection intrapéritonéale, 1 ml de G. R. M. lavés et 1 ml d'une suspension de *Br. abortus* tués (1 milliard de germes), à cinq reprises, à quatre jours d'intervalle.

Le premier lot reçoit, lors de la première injection d'antigène, 1 mg de cortisone par voie intramusculaire, et ensuite, pendant dix jours consécutifs.

Le deuxième lot reçoit pendant dix jours consécutifs, 1 mg de cortisone par jour, en injection intramusculaire, à partir du onzième jour après le début des injections d'antigènes.

Le troisième lot sert de témoin.

Testé avant l'expérience, le sérum des cobayes s'est montré dépourvu de toute activité hémolytique pour les G. R. M., comme de tout pouvoir agglutinant pour *Br. abortus*.

Au dixième jour, le sérum des cobayes, testé quant à son pouvoir hémolytique pour les G. R. M. a permis de constater l'existence d'hémolysines aux taux de 1/32 et 1/64 pour les cobayes du premier lot et au taux de 1/256 pour les cobayes des



deux autres lots, tandis qu'aucun pouvoir agglutinant pour l'*Abortus* n'était manifesté.

Au vingtième jour, le sérum des cobayes des trois lots possède des hémolysines actives à 1/256 pour les G. R. M. Seuls les cobayes du troisième lot présentent des agglutinines au taux maximum de 1/40 pour *Abortus*. Les cobayes des deux premiers lots n'en présentent pas trace.

Au trentième jour, les hémolysines anti-mouton sont demeurées, pour les trois lots, aux taux de 1/256. Quant aux agglutinines pour *Abortus*, si elles sont passées aux taux de 1/320 et 1/640 pour les cobayes du troisième lot (témoin), elles s'élèvent à peine au taux de 1/20 pour les cobayes des deux premiers lots (graph. 1 et 2).

b) Trois lots de 3 lapins du poids moyen de 2,500 kg reçoivent en première injection intraveineuse, puis en deux injections intrapéritonéales, à quatre jours d'intervalle, 2 ml de G. R. M. lavés et 1 ml d'une suspension de *Br. abortus* tués (1 milliard).

Le premier lot reçoit, lors de la première injection d'antigènes, 2 mg de cortisone par kilogramme, par voie intramusculaire, et ensuite, pendant dix jours consécutifs.

Le deuxième lot reçoit, pendant dix jours consécutifs, par voie intramusculaire, 2 mg de cortisone par kilogramme, à partir du onzième jour après le début des injections d'antigènes.

Avant l'expérience, le sérum des lapins ne présentait aucune trace d'hémolysine pour les G. R. M., ni d'agglutinines pour l'*Abortus*.

Au dixième jour, le taux des hémolysines anti-mouton, sensiblement le même pour les trois lots, est de 1/32. Il en est de même pour le taux des agglutinines pour *Abortus* (1/320), sauf pour le lapin AC<sub>2</sub> du premier lot (1/20 seulement).

Au vingtième jour, le taux des hémolysines anti-mouton, augmenté pour tous les lapins, est égal au 1/64. Le lapin AC<sub>2</sub> est mort au dix-huitième jour. En ce qui concerne les agglutinines pour *Abortus*, les lapins du premier lot présentent des taux de 1/640. Les lapins du deuxième lot présentent des différences notables : lapin BC<sub>1</sub>, taux de 1/320 avec phénomène de zone jusqu'au 1/40 ; lapin BC<sub>2</sub>, 1/60 seulement ; lapin BC<sub>3</sub>, 1/320 avec phénomène de zone jusqu'au 1/20. Les sérums des témoins agglutinent l'*Abortus* aux taux de 1/1 280 (lap. T<sub>1</sub>) et de 1/640 (lap. T<sub>2</sub> et T<sub>3</sub>).

Enfin, au trentième jour, le taux des hémolysines anti-mouton atteint 1/128 pour les lapins des deux premiers lots et 1/512 pour les lapins témoins. Le taux des agglutinines pour *Abortus* demeure inchangé, 1/640, pour les lapins du premier lot, et s'est abaissé pour les lapins du deuxième lot : lapin BC<sub>1</sub>, 1/160 avec zone



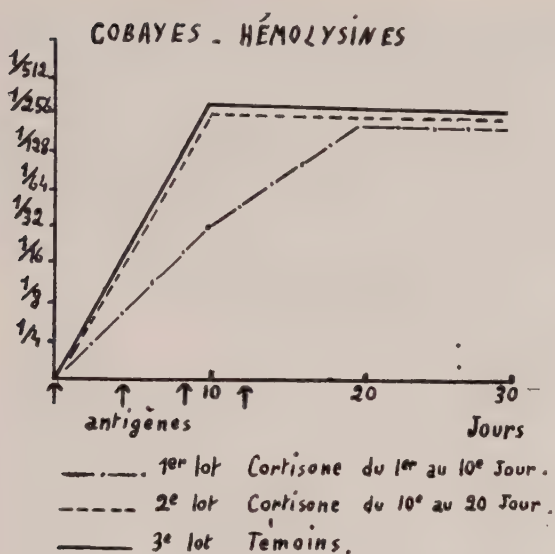


FIG. 1.

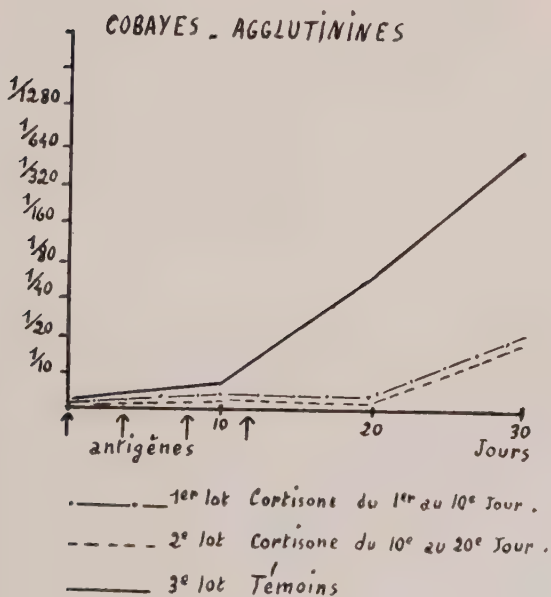


FIG. 2.

jusqu'au 1/20 ; lapin BC<sub>2</sub>, 1/180, avec zone pour 1/10 ; lapin BC<sub>3</sub>, 1/160. Les taux d'agglutination pour les témoins sont : 1/2 560, lapin T<sub>1</sub>, et 1/1 280, lapins T<sub>2</sub> et T<sub>3</sub> (graph. 3 et 4).

II. Trois lots de 3 lapins de 2 kg environ ont été immunisés en même temps qu'ils étaient soumis au traitement hormonal : 1 lot a été traité par la cortisone, 1 lot par l'ACTH, 1 lot témoin n'a reçu que l'antigène.

L'antigène utilisé est préparé à partir d'une culture de *Salmo-*

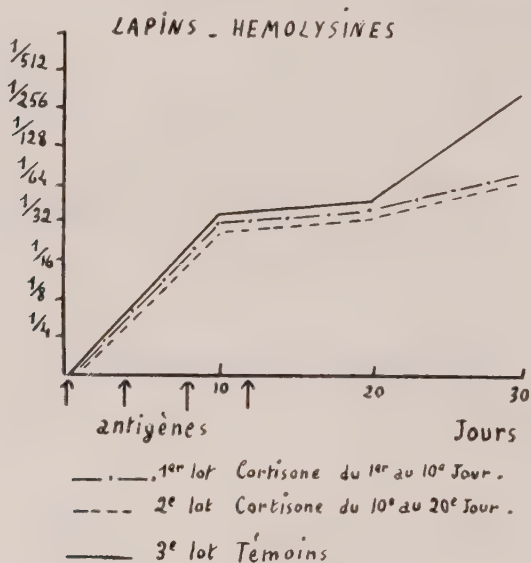


FIG. 3.

*nella paratyphi* B (n° 77), smooth, traitée par l'alcool pour obtenir l'antigène O : une culture de vingt-quatre heures sur gélose est émulsionnée en eau salée à 8,5 p. 1 000. On ajoute une quantité égale d'alcool éthylique absolu et on laisse douze heures à l'étuve. La suspension est ensuite lavée, reprise par une même quantité d'eau salée et diluée enfin dans l'eau salée de façon à avoir une dilution finale d'environ 1 milliard de germes au centimètre cube.

Le premier jour de l'expérience, un sérodiagnostic d'agglutination avec des antigènes standard O et H est fait à chaque lapin, pour vérifier l'absence d'agglutinines anti-*Salmonella*. Tous les lapins reçoivent ensuite 2 cm<sup>3</sup> d'antigène par voie intrapéritonale. En outre, les animaux du premier lot reçoivent 5 mg de cortisone par voie intramusculaire ; cette dose continuera à

leur être administrée quotidiennement pendant neuf jours, en sorte que finalement chaque lapin aura reçu 45 mg de cortisone. De même les lapins du deuxième lot reçoivent chacun 0,75 mg d'ACTH par jour, pendant le même temps (dose totale, 6,75 mg). Le troisième lot ne reçoit que l'antigène sans aucun autre traitement. Une deuxième injection d'antigène analogue à la première est faite à tous les animaux le cinquième jour. Le taux des agglutinines est suivi pour chaque lapin par des séro-agglutinations

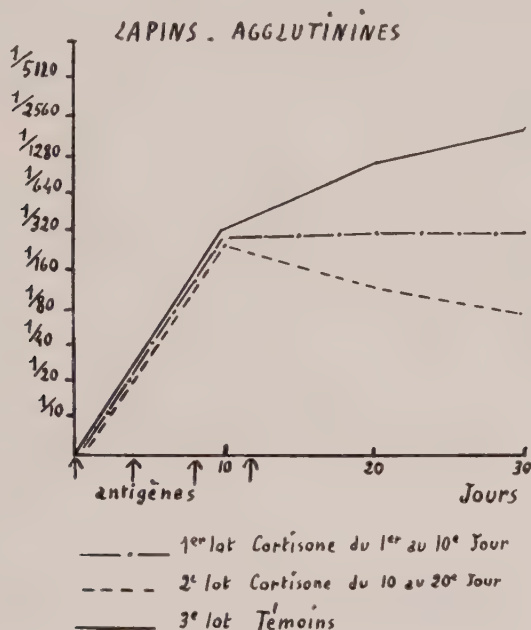


FIG. 4.

effectuées à l'aide du même antigène qui a servi à immuniser les animaux. Au quarantième jour de l'expérience (soit trente jours après la fin du traitement hormonal), une nouvelle injection d'antigène est faite à tous les animaux. Les résultats sont reportés sur le graphique 5 et représentent pour chaque lot la moyenne des animaux du lot.

Comme en témoigne ce graphique :

1° Dès le début de l'expérience, les taux d'agglutinines des lapins traités par l'ACTH sont inférieurs à ceux des témoins, des deux tiers environ.

(Au dixième jour, c'est-à-dire le dernier jour du traitement, les lapins témoins agglutinent aux taux de : 1/1 280, 1/1 280,

1/640, soit en moyenne 1/1 066 ; les lapins ACTH aux taux de : 1/640, 1/320 et 1/160, soit en moyenne 1/375.) Cette différence existe encore trente jours plus tard.

(Au quarantième jour, lapins témoins : 1/320, 1/160, 1/80, moyenne 1/185 ; lapins ACTH : 1/160, 1/80, 1/40, moyenne 1/93.)

L'action de la cortisone est également nette, mais ne paraît pas persister plus de trois jours après l'interruption du traitement et est moins marquée que celle de l'ACTH.

(Au dixième jour, mêmes témoins que précédemment ; lapins cortisone : 1/240, 1/640, 1/160, moyenne 1/480.)

(Au treizième jour, témoins : 1/640, 1/640, 1/320, moyenne

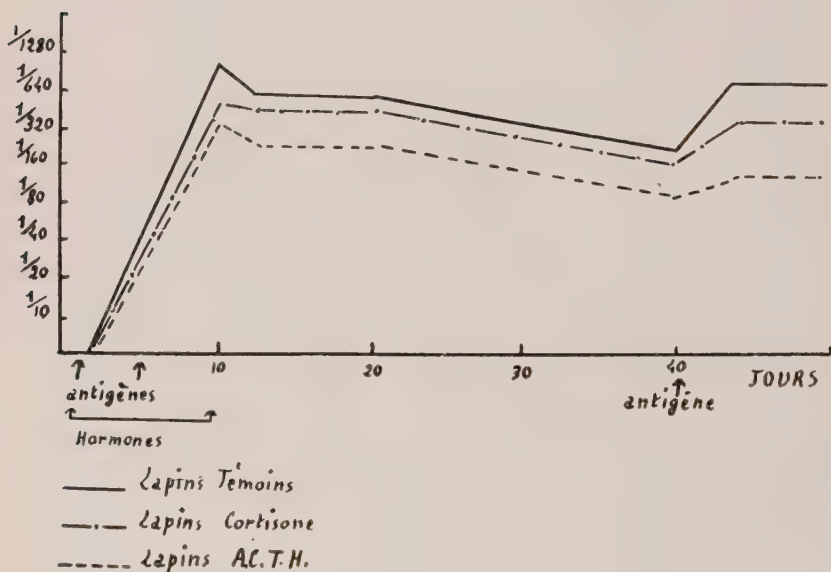


FIG. 5.

1/533 ; lapins cortisone : 1/640, 1/640, 1/80, moyenne 1/455.)

(Au quarantième jour, mêmes témoins que précédemment ; lapins cortisone : 1/320, 1/160, 1/40, moyenne 1/175.)

Lorsqu'on fait une injection antigénique de rappel, trente jours après l'arrêt du traitement hormonal, l'élévation du taux des anticorps se produit pour les trois lots d'animaux ; elle est cependant moins importante chez les animaux précédemment traités par l'ACTH ou la cortisone.

(Témoins : 1/1 280, 1/640, 1/320, moyenne 1/740 ; lapins cortisone : 1/640, 1/320, 1/160, moyenne 1/375 ; lapins ACTH : 1/160, 1/160, 1/40, moyenne 1/153.)

2° Deux mois après le début de l'expérience, les taux d'agglutination observés avec les sérums des lapins traités à la cortisone sont sensiblement égaux à ceux des témoins ; par contre, chez les lapins qui ont reçu l'ACTH, le taux des anticorps a continué à baisser fortement. Cette constatation faite, il est procédé à une injection antigénique de rappel chez tous les lapins, suivie, vingt-quatre heures après, de l'injection, dans chaque lot respectif, d'une dose unique, soit de 5 mg d'ACTH, soit de 5 mg de cortisone. Dans ces conditions, comme le montre le graphique 6, la cortisone déclenche une montée plus précoce des anticorps, de même

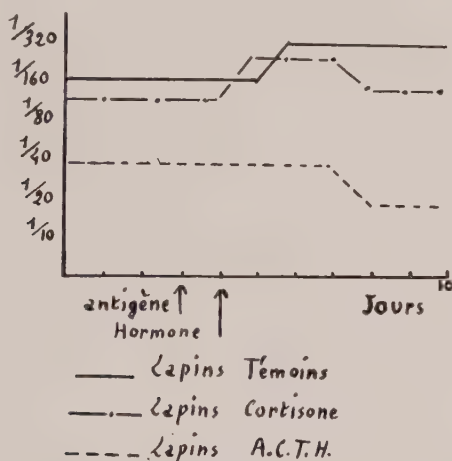


FIG. 6.

valeur, mais de période plus courte, comparativement aux animaux témoins, tandis que les lapins recevant l'ACTH ne réagissent pas.

Nos conclusions rejoignent donc celles de Fischel, entre autres :

Injectés en même temps que l'antigène, l'ACTH et la cortisone diminuent la production d'anticorps. Cette action est d'ailleurs moins importante, pour ce qui concerne la cortisone, que dans les expériences de Germuth et Ottinger ; il est vrai que nous avons utilisé des doses bien plus faibles.

Pour l'ACTH, par contre, l'emploi de doses faibles paraît avoir autant d'effet que les fortes doses.

Dans une dernière expérience, nous avons injecté une seule dose, relativement élevée, de cortisone à un lapin ayant reçu, plusieurs jours auparavant, des suspensions de *Brucella* par voie veineuse. Ce lapin (lapin C), le 26 octobre 1951, à 9 h. 30,

présente 6 960 000 hématies par millimètre cube et 5 500 leucocytes par millimètre cube. Son sérum agglutine l'antigène du C. R. F. O. au 1/320. Un deuxième lapin (lapin T), qui a reçu dans les mêmes conditions des *Brucella*, présente 4 660 000 hématies par millimètre cube et 4 500 leucocytes par millimètre cube. Son sérum agglutine au 1/640 l'antigène *Brucella* du C. R. F. O. Le premier lapin (lapin C) reçoit, à 10 h. 30, 15 mg de cortisone intramusculaire.

A 11 h. 30 : hématies, 3 800 000 par millimètre cube ; leucocytes, 3 100 par millimètre cube ; agglutination de l'antigène *Br.* du C. R. F. O. positive au 1/320.

A 15 heures : hématies, 1 700 000 par millimètre cube ; leucocytes, 3 500 par millimètre cube ; taux d'agglutination pour *Br.*, 1/150.

A 19 heures : hématies, 1 540 000 par millimètre cube ; leucocytes, 2 200 par millimètre cube ; taux d'agglutination pour *Br.*, 1/80 (++)).

Vingt-quatre heures après, la numération globulaire donne : hématies, 1 810 000 par millimètre cube ; leucocytes, 3 000 par millimètre cube ; taux d'agglutination pour *Br.*, 1/160 (++)).

Enfin, quarante-huit heures après, on note : hématies, 1 900 000 par millimètre cube ; leucocytes, 3 200 par millimètre cube ; taux d'agglutination pour *Br.*, 1/160 (++)).

Dans les mêmes conditions, le lapin T n'a montré que de minimes variations du nombre des hématies : 5 660 000, 5 600 000, 5 550 000, 5 340 000 par millimètre cube, et du nombre des leucocytes : 3 500, 3 420, 3 600, 2 960 par millimètre cube. Taux d'agglutination pour *Br.* invariable au 1/640.

Au sixième jour, la numération des hématies pour le lapin C donne : 5 660 000 par millimètre cube, et pour les leucocytes : 5 600 par millimètre cube, donc retour à l'état antérieur à l'injection de cortisone, mais le taux d'agglutination pour *Br.* est demeuré à 1/160 (++)).

La formule leucocytaire a révélé une baisse d'abord nette des lymphocytes, avec remontée rapide et pourcentage normal ensuite.

9 heures : lymphocytes, 64 p. 100 ; poly neutrophiles, 33 p. 100 ; éosinophiles, 2 p. 100 ; monocytes, 1.

11 h. 30 : lymphocytes, 34 p. 100 ; poly neutrophiles, 65 p. 100 ; plasmocytes, 1 p. 100.

15 heures : lymphocytes, 72 p. 100 ; poly neutrophiles, 25 p. 100 ; monocytes, 3 p. 100.

19 heures : lymphocytes, 70 p. 100 ; poly, 28 p. 100 ; monocytes, 2 p. 100.

Vingt-quatre heures après : lymphocytes, 63 p. 100 ; poly, 34 p. 100 ; monocytes, 3 p. 100.



La cortisone semble donc avoir abaissé brutalement le taux des agglutinines qui est demeuré ensuite plus bas qu'avant l'injection de l'hormone et a provoqué une leucopénie sensible, mais surtout une anémie très importante.

#### QUE PEUT-ON RETIRER DES EXPÉRIENCES RELATÉES ?

##### 1° Quant à l'action de la cortisone chez les lapins ?

Dans notre première expérience, sur ces animaux, la cortisone n'a paru avoir qu'une influence minime sur la production des hémolysines, celles-ci ont apparu au même taux pour les trois lots ; cependant, le taux de ces anticorps a augmenté plus vite et s'est maintenu à une valeur plus élevée pour les témoins ; la différence est surtout sensible vis-à-vis des lapins ayant reçu la cortisone en cours d'immunisation.

Dans les trois lots, la même différence apparaît pour les anticorps agglutinant les *Brucella* ; les lapins ayant reçu la cortisone en cours d'immunisation ont présenté le phénomène dit de zone (sans anticorps bloquants) et le taux des agglutinines a toujours été moins élevé après les injections de cortisone, alors qu'antérieurement il était égal aux taux des deux autres lots.

Dans la deuxième expérience, nous avons obtenu des réactions à peu près semblables : s'agissant d'agglutinines, la cortisone paraît influencer défavorablement l'élaboration des anticorps — du moins la teneur du sérum en agglutinines — tant que se poursuit l'apport hormonal ; par la suite, il y a presque égalité avec les témoins, la différence n'apparaissant que lors des injections de rappel ; en effet, le taux des anticorps chez les lapins ayant reçu la cortisone est inférieur à celui des témoins lors d'une injection antigénique de rappel. Enfin, lorsqu'on renouvelle l'injection d'antigène, suivie, vingt-quatre heures après, d'une dose de cortisone, le taux des anticorps monte un peu plus vite que chez les témoins, mais redescend ensuite plus rapidement. Halpern et ses collaborateurs ont signalé ces faits en étudiant le système de recharge des anticorps, le rapportant à une libération d'anticorps de stockage.

##### 2° Quant à l'action de la cortisone chez les cobayes ?

En ce qui concerne les hémolysines, l'action de la cortisone s'est montrée défavorable pour le lot d'animaux la recevant en même temps que l'antigène (en accord avec la deuxième expérience chez les lapins). Son influence a été nulle chez les cobayes recevant la cortisone en fin d'immunisation.

Vis-à-vis de la production des agglutinines pour les *Brucella*, l'action de la cortisone paraît très nette ; il y a retard sur l'apparition des anticorps dans les deux lots de cobayes recevant le produit en injection, par rapport aux témoins, et les taux sont

demeurés inférieurs par la suite (il est vrai que les *Brucella* tués se montrent de mauvais antigènes par injections intrapéritonéales chez le cobaye).

### 3° Action de l'ACTH chez les lapins ?

Cette action est plus nette ; elle apparaît dès le début des injections ; son influence persiste, même après l'arrêt de son apport. Le taux des anticorps, toujours moins élevé que chez les témoins et chez les lapins recevant la cortisone, baisse aussi plus rapidement et, s'il y a une nouvelle élaboration au trentième jour, lors d'une injection d'antigène de rappel, les agglutinines demeurent encore à un taux inférieur. La baisse est ensuite encore plus sensible (1/40 contre 1/160 pour les deux autres lots). Il faut enfin remarquer l'absence de toute réponse à l'apport d'antigène au quarantième jour, une injection d'ACTH ne produisant absolument aucun effet. Une perturbation profonde, durable, du mécanisme d'élaboration des anticorps est manifeste ; il semble que les animaux traités par l'ACTH ont perdu toute possibilité de produire des anticorps, du moins pour un antigène donné.

Nous ne pouvons donner de résultats valables quant à l'action de la cortisone et de l'ACTH sur la formule sanguine ; la cortisone, chez les lapins traités, n'a provoqué aucune modification sensible ; dans la première expérience, les hématies ont présenté un nombre à peu près constant pour les trois lots ; par contre, le nombre des leucocytes a subi des variations de sens opposé, contrastant avec la constance pour les lapins témoins (différence 100 et 750 en plus) :

a) Constante diminution (3 800 et 2 300 en moins) pour les lapins du premier lot (cortisone pendant l'immunisation).

b) Constante augmentation (2 000, 2 660, 3 400 en plus) pour les lapins du deuxième lot (cortisone après début d'immunisation).

La formule leucocytaire est difficile à interpréter. Il semble que les variations sont plus individuelles qu'en relation avec l'effet possible de la cortisone.

Signalons le cas du lapin AC<sub>2</sub> qui, dès le début de l'injection de cortisone, a présenté une perte de poids (2,500 kg, 2,300 kg, 2 kg, 1,850 kg) jusqu'à sa mort avec leucopénie intense (12 400 avant l'expérience, 4 350 au quatrième jour, 4 200 au onzième jour, après cessation de la cortisone). A l'autopsie :

*Rate* : hémorragique avec intense réaction histiocytaire. Les histiocytes sont bourrés de petits corps sphériques de nature indéterminée (ferrique ?).

*Foie* : hypertension de la veine sous-hépatique. Dilatation des sinus à la partie centro-globulaire. Dégénérescence des cellules hépatiques.

*Rein* : très intense glomérulo-néphrite. La majorité des glomés-

rules présente l'aspect de pains à cacheter. Nombreux croissants fibreux. Fibrose de la capsule. Desquamation des tubes urinaires avec nombreux cylindres. Cortico-surrénale hémorragique. Lésions que l'on ne peut attribuer à une autre cause qu'à la cortisone.

#### CONCLUSIONS.

Réduits, par le manque de cortisone et d'ACTH, à expérimenter sur un petit nombre d'animaux, nous ne saurions qu'intégrer les faits observés dans l'ensemble des résultats obtenus par les autres expérimentateurs pour en tirer des conclusions ayant quelque valeur.

Nous pensons que cortisone et ACTH agissent sûrement sur les cellules génératrices des anticorps selon la dose de l'hormone, son moment d'application, dans les deux sens opposés, mais plus généralement — surtout en ce qui concerne l'ACTH — pour gêner l'élaboration des anticorps. Leur mécanisme reste encore très hypothétique.

#### BIBLIOGRAPHIE

Pour la bibliographie générale du sujet, nous renvoyons aux récents articles de Coste et coll. et de Delaunay (références indiquées ci-dessous).

- J. H. CHASE, A. WHITE et T. F. DOUGHERTY. *J. Immunol.*, 1946, **52**, 101.  
F. COSTE, F. DELBARRE, F. LAURENT et M<sup>me</sup> F. LACRONIQUE. *La Presse Médicale*, 1950, **58**, 1337-1342.  
A. DELAUNAY. *La Presse Médicale*, 1951, **59**, 1455-1458.  
T. F. DOUGHERTY, J. H. CHASE et A. WHITE. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1945, **58**, 135.  
R. N. EISEN, M. N. MAYER, D. H. MOORE, R. R. TAN et H. C. STOERK. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1947, **65**, 301.  
E. E. FISCHER. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 1950, **26**, 255.  
E. E. FISCHER, M. LE MAY et E. A. KABAT. *J. Immunol.*, 1949, **61**, 89.  
R. C. GERMUTH et B. OTTINGER. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **74**, 815.  
B. N. HALPERN, G. MAURIC, M<sup>me</sup> A. HOLTZER et M. BRIOT. *Soc. Française d'Allergie*, séance du 19 juin 1951 ; *C. S. Soc. Biol.*, séance du 23 juin 1951.  
P. H. HERBERT et J. A. de VRIES. *Endocrinology*, 1949, **44**, 259.  
MIRICK. *Ann. Soc. Clin. invest.*, 1950, **46**.

## **CULTURE DE *BACILLUS ANTHRAÇIS* EN MILIEU CALCIQUE ET EN MILIEU OXALATÉ**

par E. RENAUX.

*(Université Libre de Bruxelles, Faculté de Médecine,  
Laboratoire de Bactériologie.)*

J. Bordet et E. Renaux [1] ont étudié l'action du calcium sur l'évolution d'une souche de bactérie charbonneuse (souche St. J.). Ils ont montré notamment que, tandis que l'enrichissement de la gélose nutritive en calcium favorise l'apparition d'une race asporogène, l'addition d'oxalate neutre de sodium à cette même gélose en vue de précipiter le calcium conserve et développe au contraire l'aptitude à la sporulation.

Depuis lors, l'entretien de cette souche pendant de nombreuses années sur gélose ordinaire d'une part, sur gélose oxalatée d'autre part, lui a conféré des propriétés nouvelles que l'on peut résumer brièvement comme suit, tout au moins pour les points qui nous intéressent ici : sur gélose ordinaire, perte totale de la virulence et diminution marquée de l'aptitude à produire des spores ; sur gélose oxalatée, virulence conservée et production très active de spores.

P. Bordet [2], étendant ces recherches à d'autres germes sporulés, germes de l'air, notamment, a obtenu, tant en milieu oxalaté qu'en milieu enrichi en calcium, des résultats fort analogues et, dans l'ensemble, confirmatifs de ceux publiés par J. Bordet et E. Renaux.

Cependant, I. Gorrieri [3], usant de techniques différentes, obtient des résultats assez discordants et, par ailleurs, souvent irréguliers. Peut-être faut-il en rechercher la cause dans le fait que, précisément, les essais n'ont pas été conduits de la même façon, ou encore, dans les qualités particulières de la souche qu'il utilise.

Quoi qu'il en soit, nous avons tout d'abord refait les expériences de Bordet et Renaux avec la souche St. J. entretenue sur gélose ordinaire depuis vingt ans. Après quelques passages sur gélose additionnée de calcium d'une part et sur gélose oxalatée d'autre part, nous avons retrouvé, dans le premier cas, la tendance à la disparition des spores et, dans le second, le phénomène inverse. Nous n'avons toutefois pu faire réapparaître la

virulence malgré des passages chez la souris. Mais il s'agit, en somme, d'une souche isolée depuis de nombreuses années et dont les qualités d'adaptation peuvent s'être fortement atténuées.

C'est pourquoi nous avons voulu faire une tentative avec une souche nouvelle que nous devons à l'obligeance du professeur P. Hauduroy et du Directeur de The Wellcome Research Laboratories. Nous leur exprimons ici nos remerciements.

Cette souche est étiquetée « *Bac. anthracis* CN 1995 ». Sa virulence est très développée pour le cobaye et pour la souris : elle présente, tant sur les milieux de culture usuels qu'à l'examen des frottis, les caractères classiques du *B. anthracis*.

Nous avons, avec cette souche, refait les expériences de Bordet et Renaux en observant scrupuleusement tous les détails de la technique. Les résultats concordent exactement avec ceux publiés il y a vingt ans. Ceci lève le doute qui aurait pu subsister après le travail de Gorrieri, sur le caractère particulier de la souche St. J.

Au cours de ces travaux, nous avons été amené à étudier simultanément deux souches filles de la souche CN 1995, isolées d'une colonie à pourtour très sinueux nettement différencié du centre. Nous les avons appelées CN collerette et CN centre, la première étant moins sporogène que la deuxième. Cette particularité se retrouve à travers les divers avatars que nous avons fait subir à ces deux souches. Après vingt heures de culture sur gélose ordinaire à 37°, la souche « centre » montre des spores innombrables, alors que la souche « collerette » ne montre que quelques spores, le phénomène ne se marquant de façon évidente que beaucoup plus lentement. Leur virulence, cependant, est égale.

Les diverses épreuves ont donc été effectuées parallèlement sur « centre » et sur « collerette ». Le fait que, compte tenu de leurs qualités particulières, les résultats sont absolument comparables nous a paru apporter une sécurité d'autant plus grande à nos observations.

Outre les milieux habituels, nous avons utilisé, après solidification par la gélose, des milieux très favorables à la culture de nombreux germes microbiens : le BHi (Brain Hearth infusion) de Difco et le BHi + pAB (ac. Paraaminobenzoïque).

L'acide paraaminobenzoïque, facteur de croissance et facteur sporogène, est utilisé en général en raison de son action antagoniste pour les sulfamides.

#### I. — INFLUENCE DU CALCIUM SUR LA RICHESSE DES CULTURES ET SUR LA SPORULATION.

Lorsqu'on ensemence le *B. anthracis* simultanément sur gélose ordinaire, sur gélose additionnée de 0,25 cm<sup>3</sup> d'une solution de CaCl<sub>2</sub> à 1 p. 100 pour 5 à 6 cm<sup>3</sup> de milieu et sur gélose addi-



tionnée de 1 cm<sup>3</sup> d'une solution à 1 p. 100 d'oxalate neutre de sodium, on observe que, après vingt-quatre heures, tandis que l'épaisseur du gazon microbien est sensiblement équivalente sur gélose ordinaire et sur gélose oxalatée, la gélose calcifiée montre une culture toujours plus grêle et cette différence se marque davantage au cours des passages suivants sur le même milieu. Elle est plus nette encore si l'on a ajouté non pas 0,25 cm<sup>3</sup> de solution calcique, mais 0,5 ou 1 cm<sup>3</sup>.

Notons que, tenant compte de ce que, lorsqu'on ajoute le chlorure calcique au milieu de culture, il se produit toujours un précipité, il faut, avant d'admettre qu'il y a un enrichissement en calcium dissous, que toutes les substances, et particulièrement les phosphates, qui donnent ce précipité au contact du chlorure calcique, aient été entraînées; dans ces conditions, il est certain que, lorsque la quantité de CaCl<sub>2</sub> est insuffisante, on peut considérer le milieu comme simplement appauvri en phosphore notamment, mais pas du tout enrichi en calcium dissous.

Lorsque la concentration en calcium est élevée, il y a en outre un retard manifeste de l'apparition du gazon microbien. En même temps se dessine, surtout dès le troisième passage, une tendance très marquée à l'asporogénéité.

Notons aussi que, comme nous l'avions vu avec J. Bordet pour la souche St. J., les frottis de cultures en présence d'un excès de Ca donnent de belles et longues chaînettes bien colorables, alors qu'elles sont courtes, ou complètement fragmentées et, en général, mal colorables sur les milieux oxalatés où la sporulation se manifeste au maximum.

Comment faut-il interpréter cette action du calcium ?

Rappelons que Jordan et Burrows [4], à côté d'autres considérations, insistent sur le fait que l'alimentation pauvre n'est pas un stimulant à la formation des spores et que celles-ci n'apparaissent que si la culture se trouve dans des conditions de température optimales pour le développement du germe.

Rappelons aussi que pour la préparation des vaccins anticharbonneux, pour lesquels on cherche à obtenir des souches asporulées et avirulentes, on cultive en général dans des conditions telles que l'un ou l'autre facteur (antiseptique, température) est, sinon une entrave, au moins un élément défavorable à l'épanouissement de la culture. On peut se demander si la tendance à l'asporogénéité sous l'influence du calcium n'est pas une conséquence du même ordre. Cette hypothèse est appuyée par une constatation d'A. Govaerts [5], à savoir que l'atténuation de la virulence de *B. anthracis* par culture à 42-43° (méthode de Pasteur) est singulièrement accélérée si le milieu est enrichi en calcium. D'autre part, étant donné que les cultures sur gélose oxalatée, donc présumées privées de calcium utilisable, sont



plus riches et manifestent une aptitude infiniment plus grande à former des spores, la question se pose de savoir si la suppression de calcium est seule en cause et si l'oxalate ne joue pas un rôle favorisant la culture de *B. anthracis* (1). Nous aurons à revenir sur ce point.

Rappelons que l'addition d'oxalate de sodium aux milieux de culture avait pour but, dans notre esprit, de supprimer le calcium dissous. Or, si on dose le calcium des milieux habituels, il apparaît que la quantité d'oxalate ajoutée au cours des expériences de Bordet et Renaux était suffisante pour insolubiliser une quantité de calcium quinze à vingt fois supérieure à celle qui s'y trouve. Nous avons été frappé cependant par cette particularité que si, parfois, l'addition d'oxalate est suivie de l'apparition d'une opalescence, dans un très grand nombre de cas, nous n'observons aucune modification visible du milieu.

En fait, les conditions optimales pour obtenir le précipité d'oxalate de calcium se trouvent aux environs de pH 5. Le milieu gélosé, solution d'une qualité un peu spéciale, fait en outre obstacle à la formation du précipité. Il n'est pas exclu d'ailleurs que les germes microbiens puissent utiliser l'oxalate de calcium si celui-ci n'est pas précipité.

Quoi qu'il en soit, nous nous sommes efforcé de préparer des milieux complètement dépourvus de Ca. A cet effet, et pour éviter d'introduire un trop grand excès d'oxalate, nous avons amené à pH 5 par addition d'HCl le bouillon ordinaire ou la gélose liquéfiée au bain-marie (bouillon gélosé à 3 p. 100), puis nous avons ajouté une solution aqueuse saturée d'oxalate d'ammonium jusqu'à l'apparition d'un précipité. Après deux heures de contact (la gélose étant maintenue à  $\pm 70^\circ$ ) on filtre sur papier, on ajuste à pH 7,1-7,2 et l'on stérilise à  $120^\circ$ . Les milieux ainsi traités ne contiennent pratiquement plus de calcium (traces indosables dans 75 cm<sup>3</sup> de milieu [G. Baur]).

Sur ces milieux décalcifiés et appauvris en diverses substances entraînées avec le précipité, les souches « centre » et « collerette », filles de CN 1995, se développent moins activement que sur les milieux d'origine. Elles gardent leurs caractères particuliers : ainsi la souche « centre » donne en vingt à vingt-deux heures des spores extrêmement nombreuses et des chaînes courtes, ou même des bactéries isolées, peu colorables, alors que la souche « collerette » donne de très belles chaînettes, mais peu de spores dans les vingt-quatre premières heures.

(1) M. G. Baur, technicien principal au service de M. le professeur Bigwood, a bien voulu, avec l'assentiment de ce dernier, faire les contrôles techniques nécessités par ces recherches. Nous le remercions très sincèrement.

Dans certains cas, il est arrivé que le milieu décalcifié ne permette pas un développement appréciable de nos souches de charbon : c'est lorsque, au cours de l'acidification, nous sommes arrivé à un pH quelque peu inférieur à 5. Nous avons ainsi vraisemblablement entraîné dans le précipité des substances nécessaires au développement du *B. anthracis*. Ce qui nous incite à formuler cette hypothèse, c'est que l'addition de tyrosine à ces milieux décalcifiés a permis un développement fort appréciable ; d'autres acides aminés : leucine, asparagine, phénylalanine ne nous ont, par contre, apporté aucun secours. Peut-être, d'ailleurs, le calcium à petites doses, comme il se trouve en certaines combinaisons dans les milieux usuels, exerce-t-il une action favorisante sur la culture de *B. anthracis*. Rappelons que, dans un travail publié en 1946, Brewer et coll. [6], après avoir indiqué que la seule vitamine indispensable au développement du *B. anthracis* est la thiamine, tandis que l'uracil, l'adénine et la guanine ne sont que des stimulants, accordent une certaine importance au calcium, magnésium, fer, manganèse et potassium comme agents ou stimulants de la croissance. Il y a vraisemblablement une concentration optima au-dessus de laquelle, au moins pour le calcium, se marque une influence retardatrice sur le développement, en même temps que se manifestent une moindre richesse de la culture et une tendance à l'asporogénéité. Il faut remarquer aussi que, lorsque la souche de *B. anthracis* a fait plusieurs passages sur milieu enrichi en calcium, elle ne récupère ses caractères primitifs (sporulation notamment), lorsqu'on la remet sur milieu favorable, qu'après un certain nombre de passages.

Quand nous avons utilisé des milieux de culture riches tels que le BHi et le BHi + pAB, nous avons observé que l'addition de calcium marque ses effets d'une façon beaucoup moins rapide et ceux-ci ne deviennent évidents que si la quantité de calcium ajoutée est sensiblement plus élevée que celle ajoutée aux milieux ordinaires. Nous avons attribué d'abord le fait à une action antagoniste exercée par certaines substances existant dans ces milieux, leur action favorisante compensant l'action retardatrice du calcium. Mais il semble que l'on puisse considérer un second facteur : l'analyse chimique de ces milieux révèle leur extrême pauvreté en calcium. Dès lors, il paraît légitime d'admettre que la quantité de calcium à ajouter, avant d'atteindre la dose que nous appellerons toxique, est nécessairement plus élevée que lorsque l'on utilise les milieux habituels.

En somme, l'action inhibitrice du calcium, aussi bien sur la croissance que sur la formation de spores, se manifeste lorsque la concentration atteint un certain degré dans le milieu. Simultanément, on observe une diminution de la virulence qui est peut-

être, elle aussi, une des conséquences de l'excès de calcium (A. Govaerts, *loc. cit.*).

En résumé, le calcium agit donc au moins sur trois propriétés : rapidité de croissance, aptitude à faire apparaître des spores, virulence.

## II. — ACTION DE L'OXALATE DE SODIUM.

Nous avons été amené à soulever déjà cette question à propos de la suppression du calcium dissous et nous avons vu que la notion d'insolubilisation du calcium ne semble pas devoir être seule retenue.

Une première expérience consiste à cultiver le *B. anthracis* sur gélose contenant des quantités variables d'oxalate avec, comme témoin, culture sur gélose ordinaire et sur gélose calcifiée. Dès le premier ensemencement, on perçoit des degrés tant dans la richesse de la culture que dans l'aptitude à sporuler. Après vingt-quatre heures, la culture sur gélose additionnée de calcium, à raison de 0,25 cm<sup>3</sup> de solution à 1 p. 100 pour 5 cm<sup>3</sup>, est manifestement plus grêle que celle sur gélose ordinaire, laquelle est sensiblement équivalente à la culture sur gélose additionnée de 0,40 cm<sup>3</sup> d'oxalate à 1 p. 100. Mais déjà, une gélose contenant de 0,8 à 1 cm<sup>3</sup> de la solution d'oxalate neutre de Na par tube de culture montre une nette avance sur les autres. Après 5 ou 6 passages, les différences s'accroissent et c'est sur la gélose fortement oxalatée que le gazon microbien est visiblement le plus riche. En même temps, l'examen microscopique montre une sporulation d'autant plus avancée que l'aspect macroscopique de la culture est plus luxuriant.

Au surplus, l'épreuve est tout aussi manifeste si nous utilisons la gélose décalcifiée au lieu de gélose ordinaire : croissance médiocre sur gélose décalcifiée, croissance moyenne sur le même milieu additionné d'oxalate neutre de Na.

L'oxalate de sodium exerce de toute évidence une action favorisante sur la croissance du *B. anthracis* et sur l'aptitude de ce germe à former des spores ; nous avons vu, par ailleurs, qu'il permet et peut-être assure la conservation de la virulence.

Il est remarquable, cependant, que cette action de l'oxalate, si manifeste dans les cultures sur milieux gélosés, est souvent irrégulière, si la culture est pratiquée en bouillon oxalaté dans des proportions comparables à celles utilisées en gélose. En fait, l'addition de 0,25 cm<sup>3</sup> d'oxalate à 1 p. 100 à 6 cm<sup>3</sup> de bouillon est favorisante pour la croissance et la sporulation, alors que l'addition de 0,5 cm<sup>3</sup>, 0,75 ou 1 cm<sup>3</sup> est nettement moins active sur ces deux propriétés.

Nous avons constaté aussi (mais cela pourrait faire l'objet d'une étude plus poussée) que le citrate et le tartrate de sodium

exercent une action identique à celle de l'oxalate pour ce qui concerne la richesse de la culture, la rapidité de développement et la formation des spores.

Il en est de même de l'acide paraaminobenzoïque (pAB), dont l'action comme facteur de croissance et comme stimulant de la sporogénèse a été confirmée.

### III. — SPORULATION, VIRULENCE, VITALITÉ.

D'un point de vue finaliste, on a considéré la sporulation comme un moyen de défense de la bactérie et il n'est pas douteux que la survivance d'une espèce microbienne est beaucoup mieux assurée si celle-ci possède cette propriété. Cependant, on sait, et nous l'avons rappelé plus haut, que, pour obtenir la formation des spores, il faut que les conditions de culture, tant au point de vue de l'alimentation qu'au point de vue de la température, soient favorables. Dès lors, il semble difficile de considérer la propriété de faire des spores comme un signe de souffrance de la bactérie. Par ailleurs, si l'on ne peut démontrer qu'il y ait une liaison entre l'aptitude à former des spores et la virulence d'une souche déterminée, il n'en est pas moins vrai que, fréquemment, un facteur, ou peut-être un ensemble de facteurs, exercent une action parallèle sur ces deux propriétés.

Nous avons rapporté, au début de ce travail, que la souche St. J. de *B. anthracis*, entretenue pendant vingt ans sur gélose ordinaire, a perdu toute virulence et a vu s'atténuer dans de fortes proportions son aptitude à sporuler, alors que, entretenue sur gélose oxalatée, elle a conservé sa virulence et continue à montrer des spores extrêmement nombreuses. Ainsi se pose la question de savoir s'il y a corrélation entre les deux propriétés : sporulation et virulence.

Déjà, en 1911, H. Preisz [7] avait tenté sans succès d'établir une relation entre la propriété de former des spores et la virulence. Notons aussi que G. Robyn [8], étudiant la souche St. J. de Bordet et Renaux après sept années d'entretien sur gélose oxalatée, constatait que la sporulation et la virulence étaient conservées ; il observait en outre que la souche devenue asporogène et avirulente par repiquage systématique sur gélose additionnée de chlorure calcique pouvait redevenir sporogène par passages sur gélose oxalatée, mais que sa virulence restait définitivement perdue. Il concluait que celle-ci est altérée à la longue par les ions Ca.

Nous avons fait une constatation identique au moyen de la même souche entretenue sur gélose ordinaire pendant vingt ans : réapparition de la sporulation, mais persistance de l'avirulence. En somme, il y a parallélisme entre l'évolution des deux pro-

priétés vers la disparition progressive, mais ce parallélisme disparaît lorsque l'on tente de les restituer à des souches chez lesquelles elles se sont lentement et progressivement atténuées. C'est ce qui résulte aussi bien de nos observations que de celles de Preisz et de Robyn. On a, par ailleurs, signalé l'existence de souches avirulentes, mais où la sporulation est très active et qui ont pu être utilisées comme vaccin [9].

*En résumé*, les résultats des essais effectués sur deux souches de *B. anthracis* montrent que l'on peut considérer l'action du calcium dans le développement de ce germe sur gélose comme une action toxique, ralentissant le développement de la culture et (peut-être corrélativement) atténuant l'aptitude à sporuler et la virulence.

On peut admettre, en outre, que l'oxalate neutre de sodium, dans le cas étudié, agit comme facteur de croissance. Cette propriété s'ajoute à celles que nous connaissions déjà : action sur la virulence et la sporulation de la souche.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. BORDET et E. RENAUX. *Ces Annales*, 1930, **45**, 1.
- [2] P. BORDET. *Ces Annales*, 1930, **45**, 26.
- [3] I. GORRIERI. *Boll. del Istituto Sieroterapico Milanese*, 1933, **12**, 402.
- [4] E. JORDAN et W. BURROWS. *Textbook of Bacteriology*, 14<sup>e</sup> édition, p. 45.
- [5] A. GOVAERTS. *Ces Annales*, 1951, **81**, 424.
- [6] C. BREWER et coll. *Arch. Biochem.* 1946, **10**, 65.
- [7] H. PREISZ. *Centralbl. Bakt. Orig.*, 1904, **35**, 657.
- [8] G. ROBYN. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 938.
- [9] M. STERNE. *Onderstepoort J. Veter. Sci.*, 1946, **21**, 41.



# BACTÉRIOPHAGE ET ENTÉROBACTÉRIES CHEZ LES POISSONS DE MER ET LE PROBLÈME DES EAUX POLLUÉES

par A. GUELIN.

(Institut Pasteur de Paris  
et Laboratoire Arago, à Banyuls-sur-Mer.)

Dans nos recherches précédentes, nous avons eu déjà l'occasion de souligner le rapport existant entre l'état sanitaire d'un lieu et les bactériophages qui y sont présents. Les phages typiques et les *perfringens* ne sont jamais isolés que dans les endroits très suspects au point de vue sanitaire. Et le taux de bactériophage *coli* suit dans ses lignes générales les fluctuations du *Bacterium coli*.

La présence de bactériophages dans une eau permet donc l'évaluation de cette eau au point de vue bactériologique. Cette évaluation, d'une importance certaine pour l'hygiène urbaine, doit s'appuyer sur des épreuves à la base desquelles se trouve la notion concernant le rapport qui existe entre les bactéries et les bactériophages des eaux.

C'est dans ce but qu'a été entreprise l'étude des bactéries et des bactériophages dans les viscères de poissons de la Méditerranée. Sans négliger les influences diverses que peuvent subir les germes au cours de leur séjour dans un organisme, il est certain que la flore bactérienne d'un poisson peut refléter dans ses grandes lignes l'état du milieu où le poisson se déplace. Il n'est pas douteux non plus que les Entérobactéries peuvent survivre plus longtemps dans le tube digestif d'un poisson que dans l'eau de mer. Kalinenko [23] a démontré la multiplication que subissent les bactéries dans l'intestin des animaux marins.

Les recherches de bactériophages dans les eaux prélevées loin des côtes montrent en général l'absence des phages intestinaux. Par contre, ces derniers sont souvent décelés dans les eaux de la zone littorale (d'Hérelle [18], Guélin [17]). Les Entérobactéries, d'après Zo Bell [42], se rencontrent exclusivement à proximité des côtes et leur quantité baisse à mesure qu'on s'éloigne vers le large.



On peut donc supposer que les poissons du large, dans la mesure où ils ne s'approchent pas des côtes, peuvent être exempts non seulement de bactériophages, mais aussi de bactéries du groupe intestinal.

En relisant les travaux de ces cinquante dernières années concernant les recherches bactériologiques sur les poissons, on constate que le plus souvent ils ont été inspirés par des questions concernant l'hygiène. Soit qu'on recherchât l'origine de la contamination de poissons commerciaux, soit qu'on se penchât sur le problème des eaux polluées, en étudiant le rapport entre les entérobactéries isolées chez les poissons et la contamination des eaux. Les Coliformes, dont la présence dans les eaux est généralement admise comme un signe de la contamination fécale, ont été l'objet principal de ces recherches. Certains travaux concernent le *Paracolon* ou le *Proteus*, mais rarement les *Salmonella* ou le *Cl. perfringens*. A notre connaissance, le bactériophage n'a jamais été étudié dans cet ordre d'idées.

En 1899, Hoag [19] isole *E. coli* à partir des viscères des poissons de mer. Whipple (1901) [39] ne retrouve pas ce germe chez 75 poissons des eaux non polluées. Amyot (1901) [4] expose les résultats positifs qu'il a obtenus avec 23 exemplaires. Kister et, ensuite, Mallanah (résultats non publiés, cités par Fromme), l'un avec 21, l'autre avec 32 exemplaires, constatent les mêmes faits. Huston (1903) [21] trouve 13 p. 100 de *E. coli* et conclut que sa présence est la suite de la contamination de l'eau de mer par les égouts. Eyre (1904) [9] considère *E. coli* comme un habitant normal de l'intestin du poisson ; son matériel a été pris à 2 milles des côtes. Johnson (1904) [22] observe *E. coli* quarante-sept fois sur soixante-sept et suppose que les poissons véhiculent ce germe à partir des eaux contaminées vers la zone propre. Bettencourt et Borges (1908) [2] signalent 2 cas de Coliformes sur 17 poissons. Fromme (1910) [12] trouve 18 poissons contaminés par *E. coli* sur 33. Browne (1917) [4] étudie les poissons présents dans les eaux non souillées et constate que 59 p. 100 hébergent soit *E. coli*, soit *Cl. perfringens*. Hunter (1922) [20] isole de l'intestin des saumons *E. coli* et *Aerogenes*. Stutzer (1926) [35] considère *E. coli* et le *Paracolon* comme faisant partie de la flore habituelle de l'intestin des poissons ; d'après lui, on ne peut pas envisager la présence de ces bactéries dans les eaux comme un signe de leur contamination. Fellers (1926) [10] démontre que le tube digestif du saumon ne contient pas, en général, *E. coli*. Reed et Spence (1929) [31] trouvent 70 p. 100 de *Proteus* chez l'églefin (*Gadus aeglefinus*), mais *E. coli* est excessivement rare. Stewart (1932) [34] ne parvient pas à déceler, lui non plus, *E. coli* et très peu d'*Aerobacter* chez l'églefin. Gibbons (1934) [45] signale, sur 43 poissons, deux fois la présence de *Proteus* et une fois celle

d'une *Eberthella*. Il observe souvent, chez les poissons à jeun, l'absence de bactéries dans l'intestin et considère que les Coliformes ne sont pas des hôtes normaux du tube digestif des poissons de mer ; lorsqu'on les constate, c'est que ceux-ci se sont contaminés dans les eaux polluées. Griffith et Fuller (1936) [46] ont trouvé, chez les poissons commerciaux, *E. coli*, probablement d'origine extérieure. Markoff (1939-1940) [29] remarque que la présence des bactéries du groupe *coli*-typhique dans les viscères des poissons indique le séjour de ces poissons dans les eaux polluées ; tôt ou tard, ils se débarrassent de ce germe. Snow et Beard (1933) [33], en étudiant 1 838 cultures isolées chez les saumons, trouvent *E. coli* dans 0,1 p. 100 des cas. Wood (1940) [40] ne trouve pas de Coliformes chez les différents poissons des eaux australiennes. Zo Bell (1941) [42], (1946) [43] ne constate pas non plus la présence de ces germes en étudiant 387 poissons et 961 échantillons d'eau de mer ; 5 cas de *E. coli* ont été observés chez les poissons pêchés à proximité des côtes ; les *Aerobacter* sont plus fréquents (73 p. 100) que les Coliformes (6 p. 100) ; d'après lui, ce n'est pas une flore habituelle des poissons mais, une fois installée, elle peut y rester un temps considérable. Fredericq (1950 [41], en étudiant l'intestin de divers animaux marins de la baie de Villefranche, constate la présence d'Entérobactériacées chez 37 poissons.

#### TECHNIQUE.

Nos recherches sur les viscères de 76 poissons ont été effectuées aux mois d'août-septembre 1951, au Laboratoire Arago de Banyuls.

Les poissons ont été pêchés soit à l'aide d'une seine et de nasses à proximité immédiate des côtes (baies de Banyuls et de Port-Vendres), soit au chalut, à quelques kilomètres de la côte, à des profondeurs de 60 à 100 m.

Les prises en profondeur étaient indispensables pour avoir des espèces n'ayant jamais eu de contact avec les eaux côtières et aussi pour éviter de prendre des poissons provenant des couches superficielles de l'eau, susceptibles d'être souillées accidentellement (passage d'un bateau, etc.).

Entre la prise des poissons et l'ensemencement des milieux, le matériel a été gardé dans des bocaux secs à basse température. L'ensemencement se faisait en trois temps :

1° Extirpation stérile des viscères qu'on place dans une boîte de Petri ;

2° Dilution de 0,1 cm<sup>3</sup> du contenu de la partie inférieure de l'intestin dans 10 cm<sup>3</sup> d'eau peptonée ;

3° Répartition de cette dilution dans les milieux sélectifs.

Chaque poisson a été étudié quant à la présence des Coliformes, de *Cl. perfringens*, des bactériophages aérobies (typhique Vi, paratyphique B, *coli*), des bactériophages anaérobies (*perfringens*).

La numération des germes totaux a été pratiquée chaque fois.

Pour l'isolement et l'identification des germes, nous avons appliqué les méthodes adoptées à l'Institut Pasteur de Lille, dans le Service du Dr Buttiaux, méthodes qui sont exposées dans son traité [3]. La recherche des bactériophages a été effectuée suivant la technique habituelle de notre laboratoire.

Au cours de la première journée, chaque dilution du contenu intestinal estensemencée (1 cm<sup>3</sup>) dans les milieux suivants :

1° Eau peptonée phéniquée (milieu de Vincent) pour la recherche de *E. coli*.

2° Bouillon lactosé à 1 p. 100 (tubes de Durham) pour la recherche des germes fermentant le lactose.

3° Gélose-sulfite-fer (milieu de Dienert et ses collaborateurs ou Wilson-Blair) pour la recherche des germes anaérobies réduisant les sulfites.

4° Plaques de gélose, pour la numération des germes totaux.

5° Eau peptonée glucosée,ensemencée préalablement avec les cultures aérobies (*Salmonella ty. Vi* Wollman, *Salmonella paraty. B* Wollman, *E. coli* 36, à raison de  $2.10^8$  germes par centimètre cube) pour la recherche des bactériophages aérobies.

6° Eau peptonée glucosée,ensemencée préalablement avec les cultures de *Cl. perfringens* (T, M, 80 b, Weinberg, Am. 8, 40, à raison de  $1.10^7$  germes par centimètre cube) pour la recherche des bactériophages anaérobies.

Les milieuxensemencés sont placés à la température de 37° (sauf le milieu de Vincent qui nécessite 42°C). Nous avons choisi cette température, car ce sont les germes de l'homme et des animaux à sang chaud que nous recherchons, et non leurs variants adaptés aux conditions nouvelles.

Après vingt-quatre heures, on procède au chauffage et à la mise en évidence des bactériophages, en présence des souches qui ont servi à les régénérer.

Après quarante-huit heures, on compte le nombre de germes sur les plaquesensemencées. Suit le repiquage des cultures (s'il y a lieu), à partir du milieu de Vincent, dans l'eau peptonée glucosée avec, ensuite, la recherche de l'indol. On recherche dans les tubes de Durham contenant le bouillon lactosé, la présence de germes fermentant le lactose et, dans les cas positifs, la culture estensemencée sur gélose de Teaque-Levine modifiée, dite « EMB » (éosine-méthylène bleu) et sur la gélose lactosée au bromocrésol pourpre. Isolement de grosses colonies noires poussées dans la gélose profonde.

Les jours suivants, on repique dans le milieu de Kligler les

colonies suspectes, apparues sur la gélose « EMB » ou la gélose lactosée au bromocrésol pourpre. Etude détaillée de ces colonies, ainsi que celles des germes anaérobies isolés auparavant.

#### RÉSULTATS.

Les 76 poissons examinés peuvent être divisés en 8 lots d'après la date et le lieu de leur capture.

1° Le 10 août 1951, à 12 km de la côte, pêche à 65 m de profondeur, 4 exemplaires :

1. *Merluccius vulgaris* Flem.
2. *Pagellus erythrinus* Cuv. et Val.
3. *Mullus barbatus* L.
4. *Gadus capelanus* Risso.

2° Le 18 août 1951, à 7 km de la côte, pêche à 100 m de profondeur, 6 exemplaires :

5. *Mullus barbatus* L.
6. *Gadus capelanus* Risso.
7. *Mullus barbatus* L.
8. *Serranus hepatus* L.
9. *Merluccius vulgaris* Flem.
10. *Serranus hepatus*.

3° Le 27 août 1951, pêche à proximité de la côte de Banyuls, 8 exemplaires :

- 12, 13. *Blennius ocellaris* L.
- 14-19. *Gobius capito* Cuv. et Val.

4° Le 3 septembre 1951, pêche à proximité de la côte de Banyuls, 10 exemplaires :

- 25-27, 29-31. *Blennius ocellaris* L.
- 22-24, 28. *Gobius capito* Cuv. et Val.

5° Le 11 septembre 1951, pêche à proximité de la côte de Banyuls, 11 exemplaires :

- 35-44. *Blennius ocellaris* L.
34. *Gobius capito* Cuv. et Val.

6° Le 12 septembre 1951, pêche à 15 km de la côte, à 100 m de profondeur, 9 exemplaires :

45. *Serranus cabrilla* L.

- 46. *Trigla cuculus* Risso.
- 47. *Gadus capelanus* Risso.
- 48. *Merluccius vulgaris* Flem.
- 49. *Trigla aspera* Vivi.
- 50. *Trigla lineata* Will.
- 51. *Serranus hepatus* L.
- 52. *Merluccius vulgaris* Flem.
- 53. *Gobius quadrimaculatus* Cuv. et Val.

7° Le 18 septembre 1951, pêche à 12 km de la côte, à 70 m de profondeur, 11 exemplaires :

- 57, 59, 60. *Gobius* sp.
- 58, 61. *Mullus barbatus* L.
- 62. *Serranus hepatus* L.
- 63. *Gadus capelanus* Risso.
- 64. *Zeus faber* L.
- 65. *Smaris vulgaris*.
- 66. *Trigla aspera* Vivi.
- 67. *Smaris maurii* Delav.

8° Le 24 septembre 1951, pêche à proximité de la côte de Port-Vendres, 16 exemplaires :

- 68, 69, 72. *Blennius palmicornis* Cuv. et Val.
- 76-78, 80-83. *Blennius palmicornis* Cuv. et Val.
- 70. *Julius vulgaris* Cuv. et Val.
- 71, 74. *Serranus hepatus* L.
- 73. *Julius giofredi* Risso.
- 75, 79. *Grenilabrus roissali* Risso.

Sous le numéro 84 figure *Morone labrax* L (« loup de mer ») pris dans la baie de Banyuls à l'aide d'un fusil. C'est le seul exemplaire de grande taille ; la longueur des autres poissons ne dépassait pas 10 à 15 cm.

Ces 8 lots de poissons peuvent être à leur tour classés en deux grands groupes : l'un, comprenant 30 poissons pêchés au large, et l'autre comprenant 46 poissons pris dans la zone littorale.

Dans les viscères des poissons pêchés au large, nous n'avons jamais constaté la présence de germes du groupe intestinal, tels que *E. coli* ou *Cl. perfringens*, ni de bactériophages *coli*, typhique ou *perfringens*. Les 2 cas (n° 3 et n° 6) où nous avons isolé un germe unique réduisant les sulfites peuvent probablement être mis sur le compte d'une contamination secondaire. Dans la plupart des cas, la gélose, et souvent même le bouillon lactosé, sont restés stériles après ensemencement avec le contenu de l'intestin (exception faite pour les deux cas n°s 64 et 66, où le nombre total des germes a été respectivement de  $7.10^2$  et  $1.10^4$ ).



Ces faits n'indiquent pas la stérilité absolue de certains poissons pêchés au large. L'examen microscopique de leur contenu intestinal révélait toujours la présence de bâtonnets courts ou allongés et de cocci, d'ailleurs peu nombreux. L'isolement de ces germes nécessite des milieux spéciaux, mais leur étude ne présenterait pas d'intérêt pour nous.

Il ne faut pas oublier que la profondeur où les poissons ont été pris ne dépasse pas 100 m. Les espèces pêchées plus bas seraient-elles encore moins contaminées ? Si Russell [32] trouve dans le Golfe de Naples une quantité identique de germes, à la surface et en profondeur de 1 100 m, par contre, Drew [8], Cassebat [6] montrent leur diminution progressive vers la profondeur. Les observations de Zo Bell [42], Kriss, Roukina et Birusova [27] indiquent l'irrégularité de la distribution verticale de germes hétérotrophes dans l'Océan et la Mer Noire.

Les résultats obtenus avec les poissons de la zone côtière se présentent tout autrement. Les milieuxensemencés ont montré un développement abondant des germes aérobies et des anaérobies. Dans certains cas, la quantité totale de bactéries atteignait  $1.10^6$  par centimètre cube. La culture dans le milieu de Vincent était fréquente, parfois avec production d'indol. Le bouillon lactosé était souvent fermenté avec production de gaz. On a observé de nombreux germes produisant  $H_2S$  et des germes protéolytiques.

Sur 46 poissons, nous avons isolé : *E. coli* dans 8 cas (n<sup>os</sup> 12, 18, 19, 28, 31, 35, 39, 43), *E. intermedium* dans 2 cas (n<sup>os</sup> 41 et 79), *Aerobacter* dans 5 cas (n<sup>os</sup> 12, 17, 38, 68, 78), ainsi que *Proteus* et *Paracolon*.

Les germes anaérobies producteurs de  $H_2S$  ont été décelés chez 23 poissons. Prévot [30] indique qu'en dehors de *Cl. perfringens*, 21 espèces anaérobies du genre *Clostridium* sont capables de réduire les sulfites minéraux. En effet, sur les 23 colonies isolées, 2 seulement appartenaient au *Cl. perfringens* (n<sup>os</sup> 19 et 84).

Il est à noter que les examens de 8 exemplaires de *Holothuria tubulosa* ont fourni sept fois des germes réduisant les sulfites et pas une seule fois des Coliformes. Ces animaux vivent sur le fond et se nourrissent exclusivement de vase. Ils ont été pris à la profondeur de 20 m.

Le bactériophage *perfringens* n'a jamais été décelé dans le deuxième groupe de poissons. Ceux de *Salmonella* non plus, excepté le cas de *Morone labrax* L (n<sup>o</sup> 84), où un phage paratyphique B a été isolé. Le bactériophage actif sur *E. coli* 36 a été trouvé seulement dans 3 cas (n<sup>os</sup> 12, 28, 70).

L'absence des phages *perfringens* concorde bien avec les résultats de la recherche de *Cl. perfringens* (2 cas sur 46 seulement).

L'absence des phages typhiques ne pourra être expliquée qu'après la recherche des *Salmonella* dans les viscères de ces poissons.

L'absence presque totale des phages *coli* (3 cas sur 46) peut être due soit à la réceptivité insuffisante de la souche prise pour les recherches des phages *coli*, soit à une forte dilution, par les eaux du large, des eaux contaminées. Le Dr Buttiaux suggère aussi que le bactériophage *coli* ne survit peut-être pas dans le tube digestif des poissons, ce qui mérite d'être étudié.

La spécificité étroite des souches *E. coli* vis-à-vis du bactériophage de ce groupe est bien connue. La souche choisie pour nos recherches (C 36) a pu demeurer résistante aux phages *coli* qui se trouvaient éventuellement dans les viscères des poissons. A l'avenir, nous pensons qu'il sera préférable d'utiliser comme souches détectrices des phages *coli*, les *E. coli* isolés chez les poissons.

Si le bactériophage *coli* n'est pas fréquent chez les poissons étudiés, on peut remarquer aussi que *E. coli* ne s'y rencontre pas souvent non plus. Nous ne l'avons trouvé que dans 8 cas sur 46 (et 2 cas de *E. intermedium*). Il ne faut pas oublier que les eaux très souillées à proximité des côtes se trouvent vite diluées dans la masse des eaux du large. Diénert [7] a déjà insisté sur la dilution comme un des facteurs d'assainissement des eaux de mer.

D'autres causes peuvent aussi intervenir dans la disparition rapide des microorganismes. De Giaksa [14], en 1889, étudiant la survie des bactéries, a conclu que certains germes pathogènes disparaissent plus vite des eaux de mer que des eaux douces. D'après l'auteur, la reproduction de ces germes dans les eaux non stérilisées est empêchée par la concurrence des microorganismes banaux.

Le rôle du plancton est aussi important (Voročilova et Dianova [37], Gaevskaya [13], Kriss et Roukina [26], Devèze [5]. Certains auteurs ont démontré la toxicité de l'eau de mer vis-à-vis des bactéries (Cassedebat [6], Lipman [28], Korinek [24], Zo Bell [41], Wakman et Hotchkiss [38], Krassilnikov [25], Vaccaro, Brigs, Carey et Ketchum [36].

Ainsi, les poissons ne sont pas toujours contaminés par *E. coli* et peuvent être exempts du bactériophage *coli*.

Nos observations confirment le rapport déjà signalé entre la teneur en bactériophage d'un échantillon d'eau et l'état bactériologique du milieu où cet échantillon a été prélevé. Comme nous l'avons déjà dit, l'eau de la zone littorale contient souvent les phages *coli*-typhiques, tandis que l'eau du large ne les contient pas. Les poissons, en se déplaçant continuellement dans ces endroits, prennent contact avec un volume d'eau beaucoup plus grand que le volume des échantillons. A l'examen des viscères

de ces poissons, nous constatons que les eaux du large renferment des espèces exemptes d'Entérobactéries, parasites de l'intestin humain et de germes capables de se développer sur les milieux usuels, tandis que les poissons de la zone littorale contiennent de nombreux germes, parmi lesquels les bactéries intestinales de l'homme et des animaux à sang chaud.

L'absence d'Entérobactéries chez un poisson traduirait donc l'absence de la contamination bactérienne des eaux où ce poisson se déplace et corroborerait ainsi la recherche négative des bactériophages dans les prélèvements de ces eaux.

Nous sommes heureuse d'adresser nos vifs remerciements à tous ceux qui ont bien voulu nous aider dans ce travail.

P. Nicolle, de l'Institut Pasteur, qui nous a suggéré l'idée des recherches sur les poissons ;

Le Dr Buttiaux, de l'Institut Pasteur de Lille, qui nous a initiée aux méthodes pratiquées dans son service pour l'étude des Coliformes et nous a guidée sans cesse dans nos recherches. Nous avons largement profité de ses connaissances ;

M. Delamare et M. Bougis, du Laboratoire Arago, qui ont effectué une importante partie de ce travail. Ce sont eux qui ont décidé du choix des lieux et du matériel.

M. Mario Ruivo, du Laboratoire Arago, qui a identifié les poissons capturés dans les eaux côtières ;

Outre les poissons, nous avons examiné, à titre d'essai, quelques exemplaires d'Holothuries, pêchées à la profondeur de 20 m par les plongeurs de l'équipe de scouts dirigée par M. Gallerne.

Nous tenons spécialement à exprimer toute notre reconnaissance à M. le Professeur Petit, Directeur du Laboratoire Arago, qui nous a accueillie à la Station Maritime et nous a procuré tous les moyens de travail nécessaires. Il nous a constamment conseillée.

#### RÉSUMÉ.

L'étude des bactéries et des bactériophages du groupe intestinal a été effectuée chez 76 poissons capturés soit au large, soit dans les eaux côtières de la Méditerranée.

Chez les poissons du large, où les eaux ne contiennent pas de phages *coli*-typhiques, l'intestin est souvent exempt des germes capables de se développer sur les milieux usuels.

Chez les poissons capturés dans les eaux de la zone littorale qui renferment des bactériophages *coli*-typhiques, l'intestin contient de nombreux germes, parmi lesquels des bactéries du groupe intestinal.

Ces observations confirment le rapport déjà signalé entre la teneur en bactériophages d'un échantillon d'eau et l'état bactériologique du milieu où cet échantillon a été prélevé.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. AMYOT. *Transact. Am. Publ. Health Ass.*, 1901, **27**, 402 (cité d'après Fromme).
- [2] A. BETTENCOURT et A. BORGES. *Arch. Real Inst. Bact. Camara Pestana*, 1908, **2**, 221 et 245 (cité d'après Browne).
- [3] R. BUTTIAUX. *L'analyse bactériologique des eaux*. Flammarion, Paris, 1951.
- [4] W. BROWNE. *J. Bact.*, 1917, **2**, 417.
- [5] L. DEVÈZE. *Bull. Inst. Océanogr.*, 1950, n° 973.
- [6] P. CASSEDEBAT. *Rev. Hyg. et Police Sanit.*, 1894, **16**, 104.
- [7] F. DIÉNERT et GUILLERD. *Ann. Hyg. Publ.*, 1940, **18**, 209.
- [8] G. DREW. *Yearbook Carnegie Inst. Wash.*, 1912, **11**, 136 (cité d'après Kriss, Roukina et Birusova).
- [9] J. EYRE, M. DURCH et F. EDIN. *Lancet*, 1904, **1**, 648.
- [10] C. FELLERS. *Univers. Wash. Publ. Fish.*, 1926, **1**, 157 (cité d'après Griffith).
- [11] P. FREDERICQ. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 986.
- [12] W. FROMME. *Zeitschr. Hyg.*, 1910, **65**, 275.
- [13] N. GAIEWSKAYA. *J. Zool.*, 1939, **18**, 6.
- [14] DE GIAXA. *Zeitschr. Hyg.*, 1889, **6**, 162.
- [15] N. GIBBONS. *Contr. Canad. Biol. Fish. N. S.*, 1934, **8**, 275 et 291 (cité d'après Zo Bell).
- [16] F. GRIFFITH et F. FULLER. *Am. J. Publ. Health*, 1936, **26**, 259.
- [17] A. GUELIN. *Ces Annales*, 1952, **82**, 78.
- [18] F. D'HERELLE. *Le Bactériophage, son rôle dans l'immunité*. Masson, Paris, 1921, 277.
- [19] HOAG (cité d'après Fromme).
- [20] A. HUNTER. *J. Bact.*, 1922, **7**, 85.
- [21] A. HUSTON. *Ann. Rep. Gov. Board Med. Off.*, 1903-1904, supp. 33 (cité d'après Browne).
- [22] G. JOHNSON. *J. Infect. Dis.*, 1904, **1**, 348.
- [23] V. KALINENKO. *Microbiologia*, 1951, **20**, 320.
- [24] J. KORINEK. *Zentralbl. Bact.*, 1927, II, **71**, 73.
- [25] N. KRASSILNIKOV. *Microbiologia*, 1938, **7**, 329.
- [26] A. KRISS et E. ROUKINA. *Microbiologia*, 1949, **18**, 141.
- [27] A. KRISS, E. ROUKINA et V. BIRUSOVA. *Microbiologia*, 1952, **20**, 296.
- [28] CH. LIPMAN. *J. Bact.*, 1926, **12**, 311.
- [29] W. MARKOFF. *Zentralbl. Bact.*, 1939-1940, II, **101**, 151.
- [30] A.-R. PRÉVOT. *Ces Annales*, 1948, **75**, 571.
- [31] G. REED et C. SPENCE. *Contr. Canad. Biol. Fish. N. S.*, 1929, **4**, 257 (cité d'après Zo Bell).
- [32] H. RUSSELL. *Zeitschr. Hyg.*, 1891, **11**, 165.
- [33] J. SNOW et P. BEARD. *Food Res.*, 1939, **4**, 563 (cité d'après Zo Bell).
- [34] M. STEWART. *J. Mar. Biol. Ass.*, 1932, **18**, 35 (cité d'après Zo Bell).
- [35] M. STUTZER. *Zentralbl. Bact.*, 1926, **66**, 344.

- [36] R. VACCARO, M. BRIGGS, C. CAREY et B. KETCHUM. *Am. J. Publ. Health*, 1950, **40**, 1257.
- [37] A. VOROCHILOVA et E. DIANOVA. *Microbiologia*, 1937, **6**, 6.
- [38] S. WAKSMAN et M. HOTCHKISS. *J. Bact.*, 1937, **33**, 389.
- [39] G. WHIPPLE. *Tech. Quart.*, 1901, **14**, 21 (cité d'après Johnson).
- [40] E. WOOD. *Austr. Counc. Sci. Ind. Res. Melbourne*, Pamphlet, 1940, n° 100, 1 (cité d'après Zo Bell).
- [41] C. Zo BELL. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1936, **34**, 113.
- [42] C. Zo BELL. *J. Bact.*, 1941, **42**, 284.
- [43] C. Zo BELL. *Marine Microbiol.*, U. S. A., 1946.



# LES GROUPES SANGUINS DES ÉQUIDÉS

## I. — LES GROUPES SANGUINS DES MULETS

par A. EYQUEM et L. PODLIACHOUK (\*.)

(*Institut Pasteur.*

*Laboratoire d'Hématologie et des Groupes sanguins*

[Service du D<sup>r</sup> DUJARRIC DE LA RIVIÈRE].)

On sait que si les chevaux peuvent être séparés en 4 groupes sanguins principaux, comme l'ont montré en particulier M. Dujarric de la Rivière et Kossovitch en 1928, il existe de nombreuses exceptions à ce schéma et il est ainsi difficile de reconnaître les nombreux sous-groupes, même lorsqu'on utilise, comme l'a fait Lehnert, des iso-immunsérums.

Aussi, considérant les résultats sérologiques intéressants obtenus par Bessis et Caroli dans l'étude des sérums de juments mulassières, ainsi que ceux obtenus antérieurement par Landsteiner et van der Scheer et, plus récemment, par Chary, nous avons entrepris, sous la direction de M. Dujarric de la Rivière, une étude systématique des interagglutinations des sangs de chevaux, de mulets et d'ânes, pour tenter de dissocier les facteurs en présence.

Rappelons que Landsteiner et van der Scheer, utilisant en 1924 des hétéro-immunsérums de lapins anti-cheval ou anti-âne, avaient constaté que ces sérums présentaient un titre analogue vis-à-vis des globules rouges des deux espèces ; après absorption il ne persistait qu'un anticorps actif vis-à-vis de l'une des espèces. Ces sérums permettaient de constater que le mulet présente des antigènes globulaires provenant des deux espèces. Sa parenté sérologique semble plus étroite avec le cheval qu'avec l'âne, un immunosérum de lapin anti-globules rouges de mulet présentant une plus grande analogie avec un immunosérum anti-cheval.

Landsteiner avait aussi constaté que le sérum d'âne agglutine les globules rouges de tous les chevaux et les globules rouges de mulet, sauf un. Walsh, à la même époque, avait observé que le sérum d'âne présente une agglutinine active vis-à-vis de 80 p. 100

(\*) *Société française de Microbiologie*, séance du 3 avril 1952.

des chevaux, alors que le sérum de cheval ne présente pas d'agglutinine anti-âne.

Caroli et Bessis ont insisté sur le taux particulièrement élevé des agglutinines anti-baudet présentes dans le sérum de juments mulassières tachées de jaunisse.

Chary, examinant l'interagglutination des sangs de 5 ânes et 150 chevaux, constate que dans tous les cas, le sérum d'âne présente une agglutinine anti-cheval, dont le titre varie de  $1/4$  à  $1/64$ , alors que le cheval ne présente qu'une agglutinine d'un taux inférieur à  $1/8$ .

C'est au cours d'une étude systématique que nous avons obtenu des résultats intéressants grâce à l'utilisation de sérums d'âne ou de sérums de baudet du Poitou, de sérums de mulet, de sérums de jument mulassière obtenus par Millot grâce à la bienveillance de M. Saint-Martin et à l'aide de sérums de juments poulinières aimablement fournis par R. Coombs.

TECHNIQUE. — Les réactions d'agglutination sont effectuées en utilisant les sérums frais ou les sérums conservés à moins  $20^{\circ}$ , après prélèvement stérile. Les sérums sont mis en présence, en tubes à hémolyse, de suspensions à 1 p. 100 dans de l'eau physiologique de globules rouges provenant de prélèvements veineux effectués sur citrate de soude, sous un volume de 0,05 ml de sérum pour 0,05 ml de suspensions de globules rouges. La lecture est effectuée après deux heures de contact à la température du laboratoire, à l'aide de miroir concave. Les résultats, difficiles à interpréter, sont contrôlés après deux minutes de centrifugation à 1 800 tours et un examen microscopique si on soupçonne la formation de rouleaux. On examine l'action de sérum pur et de fraction de ce sérum ayant été soumise à des absorptions à l'aide de globules rouges lavés de différents mulets.

RÉSULTATS. — Nous avons pu, ainsi, examiner les antigènes présents sur les globules rouges de 65 mulets à l'aide de sérums de 65 mulets et de 9 ânes, dont 5 baudets du Poitou.

Ces sérums purs ont fourni 302 fractions de sérums absorbés. L'exécution de 17 000 réactions d'agglutination nous a permis de distinguer différents groupes sanguins chez les mulets que nous proposons de classer sur la base de l'existence de 4 antigènes principaux, A, B, C, D. Nous avons ainsi rencontré des animaux appartenant aux groupes A, B, C, D, AB, AC, AD, ABC, ABD, 0 (0 correspondant à l'absence d'antigène A, B, C, D).

Nous n'avons pas rencontré d'animaux appartenant aux groupes BD, BCD, CD, ACD, ABCD (tableau I).

Chez ces mulets, nous avons rencontré à l'état pur les agglu-

TABLEAU I.

SERUMS DE MULETS ET D'ÂNES	Nombre de mulets	4	8	10	1	5	6	1	6	10	1	13
	Type de globules rouges de mulets	A	B	C	D	AB	AC	AD	BC	ABC	ABD	O
	1040 anti A	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
	1045 anti C	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
	865 anti BC	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
	865 absor.anti B	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
	906 anti AD	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
	906 absor.anti D	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	905 anti ACD	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	994 anti ABCD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Ane 3 anti D	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	Ane 4 anti AD	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
	Bau.5 anti AC	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-

tinines anti-A, anti-B, anti-C, anti-D et enfin associées les agglutinines anti-A, anti-C et anti-D.

Ces agglutinines peuvent exister dans le sérum d'un animal dont les globules ne possèdent pas l'antigène correspondant.

Chez les ânes, nous avons constaté l'existence d'agglutinines anti-C et anti-D isolées, et associées les agglutinines anti-A et anti-D, anti-A et anti-C, anti-A, anti-C et anti-D ; mais nous n'avons pas rencontré d'agglutinines anti-B chez les ânes ou chez les baudets du Poitou (tableau II).

TABLEAU II.

AGGLUTININES ANTI-MULETS DES SERUMS D'ÂNES

	N°	ANTI A	ANTI B	ANTI C	ANTI D
Ânes	1	-	-	-	+++
	2	+	-	+	+++
	3	-	-	-	+++
	4	+	-	-	+++
Baudets du Poitou	1	-	-	+++	-
	2	+	-	-	+++
	3	+	-	-	+++
	4	-	-	-	+++
	5	+++	-	+	-

Le tableau III représente les résultats fournis par l'examen de l'action de différentes fractions d'un même sérum absorbé par les globules rouges de différents mulets et testées vis-à-vis des globules rouges de ces animaux.

Tous les baudets n'appartiennent pas aux mêmes groupes



sanguins, mais le nombre d'animaux que nous avons examinés est trop restreint pour nous suggérer un système quelconque. Par contre, les sérums de juments mulassières semblent riches de possibilités pour mettre en évidence d'autres agglutinogènes chez les mulets.

Certains sérums de juments mulassières sont actifs vis-à-vis de globules rouges de tous les mulets, tandis que d'autres n'agglutinent les globules rouges que de certains mulets.

Ces résultats sérologiques peuvent donc permettre de classer le mulet parmi les animaux pouvant intéresser le sérologiste ou l'expérimentateur et bientôt le généticien.

Nous tenons à remercier très sincèrement M. Lemétayer, directeur de l'Annexe de Garches, et ses collègues MM. les docteurs-vétérinaires Nicol, Lamy, Corvazier, Girard et Cheyroux qui ont très aimablement prélevé pour nous du sang de chevaux et de mulets.

#### BIBLIOGRAPHIE

- M. BESSIS. La maladie hémolytique du nouveau-né. Masson, édit., 1947.  
R. CHARY. *Rev. Path. Comp.*, 1950, **50**, 199-204.  
R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et N. KOSSOVITCH. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 373.  
K. LANDSTEINER et J. VAN DER SCHEER. *J. Immunol.*, 1924, **9**, 213-226.  
E. LEHNERT. Ein Betrag zur Kenntnis der Bluttypen der Pferde. Upsala, 1939.



**RÉACTION D'HÉMAGGLUTINATION PASSIVE  
ET D'HÉMOLYSE DIRECTE  
AU MOYEN DE GLOBULES ROUGES  
SENSIBILISÉS PAR DES SUBSTANCES SOLUBLES O  
ET VI D'ENTÉROBACTÉRIACÉES**

par L. LE MINOR, S. LE MINOR et J. GRABAR (\*).

(*Institut Pasteur. Service des Vaccins.*)

La sensibilisation des globules rouges de mouton par des antigènes ou par des fractions antigéniques est utilisée de plus en plus dans le but de déceler des anticorps spécifiques par hémagglutination ou hémolyse, depuis l'application de la méthode par Middlebrook et Dubos [1] pour la tuberculose. Son utilisation avec des extraits de germes autres que le bacille de Koch a été décrite par divers auteurs [2, 3, 4, 5, 6, 7].

Nous nous sommes posé la question suivante : cette méthode ne présenterait-elle pas des avantages sur les agglutinations microbiennes de certaines entérobactériacées, et spécialement sur l'agglutination *microbienne* Vi ? En effet, le choix des souches pour la préparation des antigènes Vi est délicat. En outre, les suspensions microbiennes Vi sont peu stables et demandent des contrôles constants, à chaque réaction, avec des sérums étalons. Enfin, la lecture des agglutinations Vi demande une grande expérience. Par contre, une réaction d'hémagglutination ou d'hémolyse ne présente aucune difficulté quant à la lecture. Il nous restait donc à choisir les substances destinées à la sensibilisation des globules rouges, et à étudier la spécificité et la sensibilité de la réaction vis-à-vis des immunosérums de lapins et des sérums humains.

Dans ce but, nous avons employé des substances solubles contenues dans les surnageants des suspensions bactériennes et nous avons essayé de voir si, par les méthodes d'hémagglutination et d'hémolyse, il nous serait possible de déceler les anticorps spécifiques des immunosérums.

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 mars 1952.

*Technique* : 1° Choix des souches. Différentes formes de *Sal. typhi* (V et W), les souches *Ballerup* et *E. coli* Vi furent étudiées. Nous nous sommes servis de suspensions de ces souches en eau physiologique, vivantes, tuées par la chaleur (une heure à 56°) ou par les vapeurs de toluène.

2° Les surnageants des suspensions bactériennes, centrifugées, sont additionnés de 2 p. 100 de culot de globules rouges de mouton lavés. Après un contact de deux heures à l'étuve à 37° dans un agitateur, les globules sont centrifugés et lavés trois fois dans le même volume d'eau physiologique. Dans les réactions d'hémolyse directe, nous utilisons cette suspension à 2 p. 100 et dans les réactions d'hémagglutination, cette suspension est diluée de moitié (1 p. 100).

3° Les dilutions de sérum inactivé et éventuellement absorbé par des globules rouges de mouton sont disposées sur deux portoirs à la dose de 0,2 cm<sup>3</sup> dans des tubes à hémolyse. Chaque tube du premier portoir reçoit ensuite 0,1 cm<sup>3</sup> de la suspension globulaire à 1 p. 100 sensibilisée (hémagglutination) et chaque tube du deuxième portoir 0,1 cm<sup>3</sup> à 2 p. 100 (hémolyse directe). A ces derniers, nous rajoutons 0,3 cm<sup>3</sup> de sérum frais de cobaye dilué de manière à contenir 4 unités Kolmer par centimètre cube. Le tout est placé au bain-marie à 37° pendant une heure. On fait immédiatement une première lecture. Une seconde lecture est effectuée le lendemain, après un séjour de la nuit à la température du laboratoire. On note, pour l'hémagglutination, d'abord l'aspect du culot. Puis celui-ci est remis en suspension. Nous ne comptons comme positifs que les tubes contenant des agglutinats nettement visibles à l'œil nu.

Pour chaque réaction, nous effectuons les témoins suivants : sérum + globules normaux et globules sensibilisés + eau physiologique. Les globules rouges sensibilisés se gardent plusieurs jours à la glacière à + 4° sans perdre de leur sensibilité.

# I. — ANALYSE DU SURNAGEANT D'UNE SUSPENSION CHAUFFÉE.

Des globules de mouton sont sensibilisés au moyen du surnageant d'une récolte en eau physiologique de *S. typhi* VW, chauffée une heure à 56° et contenant 20 milliards de germes au centimètre cube. Cette suspension avait été conservée trois mois à + 4°. Les titrages furent faits en présence de sérum T, A, B, C polyvalents, *Ballerup*, O 901 et R 2. Les dilutions de sérum furent de 1/100, 1/200, 1/400, etc. Pour l'hémolyse, nous avons noté par 4 l'hémolyse totale, 3 l'hémolyse retardée, 2 et 1 l'hémolyse partielle.

Les titres d'agglutination microbienne des sérums employés dans nos expériences étaient les suivants :

## A polyvalent :

A O . . . . .	800, 1 600 ±
A H . . . . .	> 25 600
T H, B H, C H . . . . .	0
T O . . . . .	200
B O . . . . .	200
C O . . . . .	Négatif.

## B polyvalent :

B O . . . . .	6 400
B H . . . . .	> 25 600
T H, A H, C H . . . . .	Négatifs.
T O . . . . .	200
A O . . . . .	200
C O . . . . .	100

## C. polyvalent :

C O . . . . .	1 600
C H . . . . .	25 000
T H, A H, B H . . . . .	Négatifs.
B O . . . . .	100
T O . . . . .	> 200
A O . . . . .	Négatif.

## T polyvalent :

T H . . . . .	12 800
T O . . . . .	6 400
A O, A H, B H, C H . . . . .	Négatifs.
B O . . . . .	200
C O . . . . .	200
Vi . . . . .	1 600

## Vi Ballerup :

Eberth Vi . . . . .	1 600
Coagglutinines . . . . .	< 100

## O 901 :

T O . . . . .	12 800
A O . . . . .	800
B O . . . . .	1 600
H . . . . .	Négatifs.

## R2 :

T H . . . . .	19 200
T O . . . . .	0

## A O :

A O . . . . .	1 600
A H . . . . .	0

## A H :

A O . . . . .	0
A H . . . . .	25 600

B O :		
B O. . . . .	6 400	
B H. . . . .	0	

B H :		
B O. . . . .	0	
B java H . . . . .	6 400	
T M non spécifique . . . . .	12 800	

TABLEAU I.

	HÉMAGGLUTINATION	HÉMOLYSE
A. . . . .	0	3 0
B. . . . .	100	4 4 3 2
C. . . . .	100	2 0
T. . . . .	6 400	4 4 4 4 4 4 4 21
<i>Ballerup</i> . . . . .	25 600	4 4 4 4 1
O 901. . . . .	12 800	4 4 4 4 4 4 4 3 1
R 2 . . . . .	0	4 4 3 2 2 0

De ces résultats, on peut conclure que le surnageant d'une suspension de *Sal. typhi* en forme VW, chauffée une heure à 56°, contient des substances solubles capables de se fixer sur le globule rouge de mouton, et de réagir spécifiquement en présence d'immunsérum de lapins. Ces substances paraissent même être plus spécifiques que les suspensions microbiennes, les coagglutinations montrant des titres inférieurs par les méthodes d'hémolyse et d'hémagglutination. Il est possible, par ces méthodes, et dans ces conditions, de mettre en évidence des anticorps spécifiques O et Vi, mais non les anticorps H.

Si on sensibilise les globules rouges avec le même surnageant, dilué vingt fois, on obtient des résultats identiques quant aux titres finaux des réactions. Notons enfin que l'agglutination sur lame d'un volume égal de sérum dilué et de globules rouges sensibilisés à 1 p. 100 donne un taux limite d'agglutination comparable au taux existant dans les tubes.

Nous avons ensuite sensibilisé des globules au moyen de surnageant d'ampoules de vaccin TAB et DT.TAB. Avec 3 séries de ces vaccins, les taux obtenus furent analogues, aussi bien avec un vaccin fraîchement préparé qu'avec des vaccins périmés (datant de plus de deux ans). Les dilutions des sérums partent de 1/100, sauf pour les sérums H qui sont dilués au 1/10, 1/20, 1/40, 1/100, 1/200...

De l'examen de ces résultats, il ressort les conclusions suivantes (tableau II) :

1° Il passe dans le surnageant des vaccins TAB et DT.TAB des

TABLEAU II.

	HÉMAGGLUTINATION		HÉMOLYSE	
	TAB	DT. TAB	TAB	DT. TAB.
<i>Ballerup</i> . . .	6 400	6 400	4 4 4 3 3 2 1	4 4 4 4 3 2 2
O 901. . . .	25 600	51 200	4 4 4 4 4 4 4 2 1	4 4 4 4 4 4 4 4 2
R 2. . . . .	20	20	4 4 4 4 3 2	4 4 4 4 4 3 1
A O . . . .	6 400	12 800	4 4 4 4 4 4 3 1	4 4 4 4 4 4 4 2
A H . . . .	0	0	2 0	2 0
B O . . . .	6 400	6 400	4 4 4 4 4 4 4 2	4 4 4 4 4 4 4 2
B H . . . .	200	200	4 4 4 4 4 4 2	4 4 4 4 4 4 2

substances solubles que l'on peut mettre en évidence par hémagglutination et hémolyse spécifique au moyen des sérums agglutinants correspondants. Les mêmes globules sont capables de fixer simultanément plusieurs substances solubles. La sensibilité de cette réaction est supérieure pour O et Vi à celle de l'agglutination des germes.

2° Il y a une discordance entre l'hémagglutination et l'hémolyse pour la mise en évidence de l'antigène H de l'Eberth et du para B.

3° La quantité de substance soluble qui se fixe sur les globules semble indépendante de sa concentration dans le surnageant du vaccin, que celui-ci soit à 20 milliards ou à 1 milliard. Le même surnageant peut d'ailleurs servir à plusieurs sensibilisations successives d'hématies, sans que le taux d'agglutinabilité de celles-ci baisse. Les vaccins de fabrication récente et les vaccins périmés, par leurs réactions, montreraient que ces substances solubles sont stables.

Il y a souvent une différence d'aspect entre les agglutinats obtenus en présence de sérum anti-O et anti-Vi. Avec ces derniers, les agglutinats sont en général très compacts, tandis qu'avec les sérums O, on a souvent un dépôt granuleux sur tout le fond du tube.

Pour le titrage des anticorps spécifiques Vi, nous avons eu recours au surnageant de suspensions en eau physiologique des souches *Ballerup* et de *E. coli* Vi (n° 2624/36) traité par le bactériophage W (P. Nicolle). Après quelques essais avec ces deux souches, nous avons choisi *E. coli* Vi de préférence à *Ballerup* : cette dernière donne parfois des réactions non spécifiques avec des sérums antityphoïdiques, à des taux très bas, il est vrai.

Pour comparer les taux obtenus avec un surnageant de souche vivante et un surnageant de la même souche chauffée une heure



à 56°, nous avons d'abord employé une récolte en eau physiologique de *E. coli* Vi, telle quelle d'une part, après chauffage d'autre part, toutes deux conservées pendant sept jours à 37°.

Les sérums étaient ici dilués au 1/10, 1/100, 1/200...

TABLEAU III.

	VIVANT		CHAUFFÉ	
	Hémagglutination	Hémolyse	Hémagglutination	Hémolyse
T. . . . .	3 200	4 4 4 4 4 3 1	6 400	4 4 4 4 4 4 3 1
H 901. . . .	0	0	0	0
O 901. . . .	0	0	0	0

La différence entre les surnageants de *E. coli* Vi vivant et chauffé est donc minime quant au pouvoir de sensibiliser les globules rouges.

Puis, nous avons sensibilisé des hématies par les surnageants en eau physiologique des 2 variantes V et W de 2 souches d'Eberth, et par le surnageant de la souche O 901.

TABLEAU IV.

	HÉMAGGLUTINATION	HÉMOLYSE	
T 556 V :			
Vivant . . . . .	10 240	5 120 (4)	10 240 (2)
Chauffé . . . . .	10 240	5 120 (4)	10 240 (2)
Toluène. . . . .	10 240	5 120 (4)	10 240 (2)
T 556 W :			
Vivant . . . . .	40 80 ±	4 4 4 4 2	
Chauffé . . . . .	40 80 ±	4 4 4 4 2	
Toluène. . . . .	80	4 4 4 2	
T 415 V :			
Vivant . . . . .	5 120	5 120 (4)	10 240 (1)
Chauffé . . . . .	5 120	5 120 (4)	10 240 (2)
Toluène. . . . .	5 120	5 120 (4)	10 240 (1)
T 415 W :			
Vivant . . . . .	40	4 4 4 4 4 1	
Chauffé . . . . .	40 80 ±	4 4 4 4 3 1	
Toluène. . . . .	40 80 ±	4 4 3 2	
O 901 :			
Vivant . . . . .	40	4 4 4 3 1	
Chauffé . . . . .	40 80 ±	4 4 3 1	
Toluène. . . . .	40 80 ±	4 4 3 1	

Ces surnageants provenaient de ces suspensions :

Vivantes (lysats de un mois à 37°) ;

Chauffées une heure à 56° ;

Tuées par les vapeurs de toluène.

Les titrages furent faits vis-à-vis d'un sérum *Ballerup* dilué au 1/10, 1/20, 1/40..., 1/20 480 (tableau IV).

Il n'y a donc pas de différence notable entre les taux obtenus avec les lysats des souches vivantes et tuées par chauffage ou toluène quant à la substance soluble Vi.

## II. — RECHERCHE DES ANTICORPS DANS LES SÉRUMS HUMAINS.

Nous avons recherché les résultats que nous pourrions obtenir par cette méthode dans la recherche des anticorps chez l'homme. Les globules étaient sensibilisés par un surnageant des 2 souches O 901 et *E. coli* Vi vivantes et chauffées une heure à 56°. Les titres furent les mêmes pour ces deux dernières.

TABLEAU V.

SÉRUMS	O 901	<i>E. coli</i> Vi
1. . . . .	80	0
2. . . . .	80	10
3. . . . .	80	0
4. . . . .	160	5 (?)
5. . . . .	80	0
6. . . . .	160	0
7. . . . .	160	10
8. . . . .	80	20

L'hémolyse fut positive + + + + au taux marqué à l'hémagglutination, et + + + ou + + pour le tube suivant.

Les sérums humains ont tous été inactivés une demi-heure à 56° et ensuite absorbés par des globules rouges non sensibilisés. L'absorption a été faite à titre d'information, mais devant les résultats identiques des sérums absorbés et non absorbés, nous avons abandonné cette opération pour l'hémagglutination. Nous ne la pratiquons que lorsque nous faisons la réaction d'hémolyse.

Les agglutinations microbiennes donnèrent les résultats suivants pour T O et Vi :

On peut donc utiliser les hématies sensibilisées dans la recherche des agglutinines O et Vi des sérums humains (vaccinés, porteurs de germes). Pour les agglutinines H, les discordances entre

TABLEAU VI.

SÉRUMS	O	Vi
1 . . . . .	20	0
2 . . . . .	80	10 ±
3 . . . . .	40	0
4 . . . . .	400	0
5 . . . . .	80	0
6 . . . . .	100	0
7 . . . . .	40	20
8 . . . . .	40	10

l'hémagglutination et l'hémolyse directe font l'objet de recherches en cours.

Nous avons examiné ces mêmes sérums humains avec des globules rouges sensibilisés par la fraction Vi préparée par Corvazier [8]. Les résultats ont été identiques à ceux obtenus avec les surnageants des suspensions microbiennes.

### III. — APPLICATION DE CES MÉTHODES AUX *E. coli* DE GASTRO-ENTÉRITE.

Nous nous sommes servis, pour sensibiliser les globules du surnageant, de vaccin préparé au moyen des souches de la collection de Kauffmann 111:B4 (Stoke W), 55/B5 (1064) et 26/B6 (F 41).

Notons qu'à trois reprises successives, le témoin de la souche 1064 a hémolysé en présence de complément.

TABLEAU VII.

	G. R. STOKÉ W		G. R. 1064		G. R. F 41	
	Hémagglutination	Hémolyse	Hémagglutination	Hémolyse	Hémagglutination	Hémolyse
Sérum Stoke W.	82 000	82 000 (4) 164 000 (3)	160	Témoin. Hémolysé.	10	40 (4) 80 (3)
Sérum 1064. . .	20	20 (4) 40 (3)	20 500		0	20 (4) 40 (3)
Sérum F 41. . .	0	20 (4) 40 (3)	0		20 500	20 500 (4) 40 000 (2)

Les titres d'agglutination microbienne de ces sérums étaient .

Stoke W . . . . .	Vivant (K) : 400.	Chauffé (O) : 6 400.
1064. . . . .	Vivant (K) : 800.	Chauffé (O) : 6 400.
F 41 . . . . .	Vivant (K) : 800.	Chauffé (O) : 12 800.

Il y a donc, dans le surnageant des suspensions de *E. coli*, des substances solubles capables de sensibiliser spécifiquement les hématies de mouton. Les taux obtenus par hémagglutination et hémolyse sont nettement supérieurs aux taux d'agglutination microbienne.

#### CONCLUSIONS.

1° Appliquées à la recherche des substances solubles O et Vi ou des anticorps spécifiques correspondants, les réactions d'hémagglutination et d'hémolyse des globules rouges de mouton sensibilisés par ces substances sont d'une spécificité et d'une sensibilité égales, sinon supérieures, à l'agglutination microbienne.

2° Toutefois, il faut noter que la réaction d'hémolyse se montre généralement supérieure à la réaction d'hémagglutination pour la recherche des anticorps spécifiques O (fait mentionné par Bier [9]) et, au contraire, l'hémagglutination paraît être supérieure pour la recherche des anticorps spécifiques Vi.

3° La simplicité de l'exécution de ces réactions et la facilité des lectures, surtout pour les réactions Vi, en font des techniques de laboratoire accessibles à tous. En effet, rien n'est plus simple que la préparation de surnageants microbiens.

4° Ces réactions sont applicables à l'étude des *E. coli* de gastro-entérites.

5° Volontairement, nous n'appelons pas ces substances solubles des antigènes. Nous rapporterons dans un prochain article les résultats de l'expérimentation sur les animaux de ces substances solubles.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] MIDDLEBROOK et R. DUBOS. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 521.
- [2] KEOGH, NORTH et WARBURTON. *Nature*, 1948, **161**, 687.
- [3] FISHER et KEOGH. *Nature*, 1950, **165**, 248.
- [4] THOMAS et MENNIE. *Lancet*, 1950, **2**, 745.
- [5] THOMAS et MENNIE. *South Afr. Med. J.*, 1950, **24**, 897.
- [6] ADLER. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **74**, 561.
- [7] SPAUN. *Acta Path.*, 1951, **29**, 416.
- [8] P. CORVAZIER. Ces *Annales* (sous presse).
- [9] O. BIER. Ces *Annales*, 1951, **81**, 650.

## LE DETERMINISME DE LA SPORULATION DE *BACILLUS MEGATHERIUM*

### IV. — CONSTITUANTS MINÉRAUX DU MILIEU SYNTHÉTIQUE NÉCESSAIRES A LA SPORULATION

par N. GRELET (\*).

(Institut Pasteur. Service des Fermentations.)

Dans trois mémoires précédents [6, 7, 8], nous avons recherché les conditions qui suffisent à produire la sporulation dans les cultures agitées de deux variants de la souche ML de *Bacillus megatherium* en milieu synthétique.

Avec le variant A, la pénurie de glucose, ou de nitrate, ou de sulfate, ou de fer, ou de zinc, provoque la sporulation ; la pénurie de phosphate produit une sporulation partielle ; au contraire, ni la pénurie de potassium, de magnésium, ou de manganèse, ni l'omission de calcium, de sodium, ou de chlorure dans la formule du milieu, n'ont cet effet. Avec le variant B, l'insuffisance de l'aération entraîne aussi une sporulation partielle.

La constatation que la pénurie de certains constituants, bien qu'elle ralentisse ou arrête la croissance, ne provoque pas de sporulation, nous a conduit à chercher si ces constituants ne sont pas nécessaires à toute sporulation.

Divers travaux antérieurs ont signalé que tel ou tel des constituants que nous avons étudiés sont nécessaires à la sporulation d'espèces variées de Bacillacées.

Le phosphate l'est pour *Clostridium botulinum*, selon Leifson, 1931 [10].

Et le potassium pour *Welchia perfringens*, selon Régnier, Prévot et Lartigaud, 1945 [11], et pour *Bacillus cereus* selon Foster et Heiligman, 1949 [4] : ces derniers auteurs observent que, en milieu organique complexe, une pénurie de potassium limitant peu la croissance réduit beaucoup la sporulation.

Knaysi, 1945 [9], note l'effet favorable du magnésium sur la sporulation de *B. mycoides* lorsque l'aération est insuffisante.

La nécessité du manganèse a fait l'objet d'une récente publi-

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 mars 1952.



cation de Charney, Fisher et Hegarty, 1951 [2], dont nous avons eu connaissance après l'achèvement de ce travail : ces auteurs concluent, en particulier avec *B. subtilis*, que la sporulation dépend spécifiquement de la présence de manganèse à une concentration plus élevée que celle requise pour la croissance végétative.

Leifson, 1931 [40], a noté aussi que le calcium stimule la sporulation de *Cl. botulinum* ; nous-même avons déjà indiqué [5] la nécessité du calcium pour la sporulation de *B. megatherium*.

D'autre part, Curran, Brunstetter et Myers, 1943 [3], ont montré par l'analyse spectrale, que les spores de Bacillacées sont plus riches que les bâtonnets en calcium et en manganèse, moins riches en potassium et en phosphore, et que la richesse des spores en calcium est en rapport direct avec leur thermorésistance.

Il convient enfin de rappeler le rôle joué par le manganèse dans la sporulation de *Sterigmatocystis nigra* : Bertrand, 1912 [4], a montré que *S. nigra* peut se développer sous certaines conditions sans former de conidies, et que celles-ci apparaissent si on augmente la teneur du milieu en manganèse.

Dans la plupart de ces travaux, les facteurs qui permettent la sporulation sont seuls étudiés, sans que les facteurs qui la produisent soient identifiés. Il ne peut donc être exclu que la pénurie du constituant étudié exerce un effet sur la sporulation en différant l'intervention du facteur sporogène.

Nous sommes donc amené à associer chacune des pénuries qui provoquent la sporulation, avec chacune de celles qui ne la provoquent pas. Mais la réalisation de deux pénuries simultanées impose des tâtonnements, et nous n'avons pu en étudier que quelques-unes.

#### MÉTHODES.

Les méthodes sont celles qui ont été décrites dans les mémoires précédents [6, 8].

Les variants A et B de la souche MI. de *Bacillus megatherium* sont cultivés dans des milieux chimiquement définis où le glucose est la source carbonée, et le nitrate la source azotée ; le pH après stérilisation est à 5,8.

Les cultures sont agitées à 30° dans des flacons d'Erlenmeyer de 150 cm<sup>3</sup> ou de 250 cm<sup>3</sup> contenant 25 cm<sup>3</sup> de milieu pour une aération suffisante, et 50 cm<sup>3</sup> pour une aération limitante.

#### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

I. L'EFFET DE LA PÉNURIE DE P, K, Mg ET Mn, SUR LA SPORULATION PAR ÉPUISEMENT DE GLUCOSE ; VARIANT A. — Nous avons choisi d'abord l'épuisement du glucose comme facteur sporogène, car la métabolisation du glucose se poursuit souvent encore après

l'arrêt de la croissance, et cela facilite la réalisation des deux pénuries simultanées. Toutefois, si on diminue trop la concentration initiale du constituant limitant par rapport au glucose consommable, celui-ci ne peut plus être épuisé, et il n'y a plus de facteur sporogène. Inversement, si la pénurie du facteur limitant est encore trop peu profonde au moment où le glucose est épuisé, la sporulation se produit comme dans le témoin.

*Pénurie de phosphate* (tableau I, culture 2). — Nous avons

TABLEAU I. — Influence de la pénurie de P, K, Mg, et Mn, sur la sporulation par épuisement du glucose ; variant A.

Glucose initial : environ 250.10 - 3 M (45 g/l).

NUMÉROS DES CULTURES et CONSTITUANTS 10 - 6 M		DURÉE DES CULTURES		
		40 heures	63 heures	115 heures
1. Témoin :	pH. . . . .	7,25	7,8	8,3
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K . 50 000	Glucose g/l.	0	0	0
K . . . . 156 000	Opacité (1) .	22,0	16,0	
Mg . . . . 100	Examen (2)	B. n., ch. 2-4.	Sp. libres. Quelques B. Granules fins.	Sp. libres. Quelques B. Granules fins.
Mn . . . . 10				
2. PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K . 5 000	pH. . . . .	5,55	8,3	8,6
	Glucose g/l.	7,0	0	0
	Opacité. . .	22,5	22,8	
	Examen . .	B. n., ch. 1. Sp. libres.	B. n., ch. 1. Sp. libres.	B. n., ch. 1. Sp. libres.
3. K . . . . 200	pH. . . . .	6,6	7,2	8,0
	Glucose g/l.	0	0	0
	Opacité. . .	22,3	18,5	
	Examen . .	B. n. ou longs bourrés d'inclusions, ch. 2-4.	B. longs. Quelques sp. incl.	Quelques B. longs, Débris hyalins et granules libres.
4. Mg . . . . 100	pH. . . . .	6,1	8,0	8,45
	Glucose g/l.	6,25	0	0
	Opacité. . .	16,7	22,2	
	Examen . .	B. n. ou à parois floues. Granules libres.	B. n. ou à parois floues. Granules libres.	B. flous. Quelques sp. incl. ou libres. Granules libres.
5. Mn . . . . 2	pH. . . . .	5,25	7,6	8,15
	Glucose g/l.	7,6	0	0
	Opacité. . .	15,8	15,9	
	Examen . .	B. n., ch. 1-4	B. n., ch. 1. Quelques sp. incl. et rares sp. libres.	

(1) L'opacité, proportionnelle à la densité optique, correspond approximativement à la matière sèche en g/l.

(2) Signification de quelques abréviations : B. n., ch. 2-4 : bacilles normaux (décrits dans le premier mémoire [6]); en chaînes de 2 à 4 éléments ; sp. incl. : spores incluses dans les bacilles.

montré antérieurement [7] que pour une concentration initiale en phosphate de  $5\,000.10^{-6}$  M — dix fois plus faible que celle du milieu témoin —, il se produit une sporulation partielle.

Cette sporulation partielle, produite ici à quarante heures, est demeurée partielle à soixante-trois heures et à cent quinze heures, bien que le glucose soit alors épuisé.

Il apparaît donc que les bacilles qui ne peuvent sporuler sous l'effet de la pénurie de phosphate en sont également incapables sous l'effet de l'épuisement du glucose. Ceci est en accord avec l'hypothèse qu'un minimum de phosphate est nécessaire dans les bacilles pour qu'ils puissent sporuler, même sous l'effet de la pénurie de phosphate.

*Pénurie de potassium* (tableau I, culture 3). — Avec  $200.10^{-6}$  M de K, le glucose  $250.10^{-3}$  M a été épuisé avant quarante heures, à peine moins vite que dans la culture témoin. Pourtant on observe à soixante-trois heures quelques spores incluses seulement, et à cent quinze heures on n'en reconnaît pas parmi les débris hyalins qui proviennent de la fragmentation des bacilles.

La sporulation a donc été fortement réduite par la pénurie de potassium.

*Pénurie de magnésium* (tableau I, culture 4). — Avec Mg :  $100.10^{-6}$  M, les modifications morphologiques antérieurement décrites se produisent : fonte des bacilles, mobilisation des inclusions réfringentes à l'intérieur des parois devenues floues, enfin libération de fins granules libres.

A la suite de l'épuisement du glucose :  $250.10^{-3}$  M, on observe à cent quinze heures quelques spores, formées sans doute dans les quelques bâtonnets qui étaient encore, à soixante-trois heures, à peu près normaux.

De même, avec Mg :  $20.10^{-6}$  M et glucose :  $100.10^{-3}$  M, ou avec Mg :  $10.10^{-6}$  M et glucose :  $25.10^{-3}$  M, nous avons constaté une forte diminution du nombre de spores formées.

*Pénurie de manganèse*. — Avec Mn :  $2.10^{-6}$  M et glucose :  $250.10^{-3}$  M (tableau I, culture 5), ou avec Mn :  $10^{-6}$  M et glucose :  $66.10^{-3}$  M (tableau II, culture 2), la pénurie de manganèse réduit beaucoup le nombre des spores qui se forment après épuisement du glucose ; les spores formées sont un peu plus petites que dans les cultures témoins.

Les cultures du tableau II ont, à quatre-vingt-sept heures, été soumises à un chauffage de quinze minutes à  $80^{\circ}$  : on compte dans la culture 1 (témoin) environ  $10^6$  germes résistants, et cent fois moins dans la culture 2 (Mn :  $10^{-6}$  M).

Dans un autre type d'expérience, nous avons centrifugé et lavé les bacilles de cultures de dix-neuf heures, quarante-trois heures et quatre-vingt-onze heures en milieu contenant Mn :  $10^{-6}$  M, et nous les avons remis en suspension dans des milieux sans glu-

TABLEAU II. — Influence de la pénurie de Mn, de l'omission de Ca, et du remplacement de Ca par Mn, sur la sporulation par épuisement du glucose ; variant A.

Glucose initial : environ 66.10 — 3 M (12 g/l).

NUMÉROS DES CULTURES et CONSTITUANTS 10 — 6 M		DURÉE DES CULTURES		
		22 h. 30	37 h. 30	47 heures
1. Témoins : Mn . . . 10 Ca . . . 1 000	pH . . . . . Glucose g/l. Opacité . . . Examen . . .	6,65 0 6,15 B. n., ch. 2-4.	7,0 0 8,95 <i>Sp. libres et quelques sp. incl. Quelques B. n.</i>	0 9,15 <i>S. libres et quelques sp. incl.</i>
2. Mn . . . 1 Ca . . . 1 000	pH . . . . . Glucose g/l. Opacité . . . Examen . . .	6,4 0 7,0 B. courts, ch. 1-4.	6,85 0 5,1 B. courts, ch. 1-2. <i>Rares Sp. incl. en formation.</i>	0 4,8 <i>B. courts, ch. 1. Rares sp. incl. et libres.</i>
3. Mn . . . 10 Ca . . . 0	pH . . . . . Glucose g/l. Opacité . . . Examen . . .	6,25 3,1 3,9 B. courts, ch. 2-4. Granules fins.	6,95 0 5,1 B. courts, ch. 1-2. <i>Quelques sp. incl. Granules fins.</i>	0 5,5 <i>Quelques B. courts et quelques sp. libres. Brouillard de granules.</i>
4. Mn . . . 1 000 Ca . . . 0	pH . . . . . Glucose g/l. Opacité . . . Examen . . .	6,8 0 6,9 B. fins, ch. 1-4. <i>Quelques sp. incl.</i>	7,15 0 4,4 <i>Sp. libres, petites. Quelques sp. incl. Quelques B. fins.</i>	0 4,1 <i>Sp. libres, petites. Quelques sp. incl.</i>

cose, et avec ou sans Mn. A l'examen microscopique, nous avons vu la sporulation se produire partout, sans différences manifestes. Mais le nombre de germes qui résistent à 90° pendant quinze minutes varie beaucoup selon que le milieu renferme ou non Mn :

onze jours après remise en suspension de la culture de quarante-trois heures, on compte au centimètre cube, sur environ 7 000 000 de germes viables, 250 000 germes thermorésistants en présence de Mn : 10<sup>-6</sup> M, et seulement 28 000 en absence de Mn :

quatre jours après remise en suspension de la culture de quatre-vingt-onze heures, on compte de même, sur environ 15 000 000 de germes, 900 000 thermorésistants en présence de Mn, et seulement 4 000 en absence de Mn.

Il semble donc que Mn peut être fixé par les bacilles déficients, même en absence de glucose, puisqu'il augmente considérablement, dans ces conditions, le nombre des germes thermorésistants.

En résumé, la pénurie de manganèse empêche partiellement la sporulation dans les cultures où le glucose est épuisé, et réduit le nombre des spores thermorésistantes lorsque la sporulation peut avoir lieu.

*Omission du calcium et remplacement par le manganèse.* — L'omission du calcium dans la formule du milieu ne modifie pas le taux de croissance, mais a pour effet, une fois le glucose épuisé, de provoquer la libération de fins granules et de diminuer beaucoup le nombre des spores formées ; celles qui se forment se distinguent des spores normales par leur faible réfringence (tableau II, culture 3).

Une certaine ressemblance des effets des pénuries de Mn et de Ca sur la sporulation, nous a conduit à remplacer Ca par Mn (tableau II, culture 4) : sur ce milieu, qui contient cent fois plus de Mn que le milieu témoin et ne contient pas de Ca, l'excès de Mn modifie la morphologie des bacilles, qui sont fins, et dont quelques-uns s'allongent jusqu'à quatre ou même huit fois la longueur des bacilles normaux. Dès l'épuisement du glucose, la sporulation se produit dans tous les bacilles, et de petites spores peu réfringentes sont libérées.

Pourtant, dans ces cultures 3 et 4, chauffées quinze minutes à 80°, on compte à quatre-vingt-sept heures seulement 10 000 germes thermorésistants environ au centimètre cube, contre 1 000 000 dans la culture témoin 1.

Ainsi, l'omission du calcium a pour effet de réduire beaucoup le nombre des germes thermorésistants, même si un excès de manganèse rétablit une sporulation à peu près normale.

II. L'EFFET DE LA PÉNURIE DE Ca SUR LA SPORULATION PAR PÉNURIE DE NITRATE, DE Fe OU DE Zn ; VARIANT A. — Lors d'anciennes expériences réalisées en remplaçant dans le milieu témoin l'eau de source par l'eau bidistillée, nous avons constaté que l'omission de Ca empêche la formation de spores thermostables non seulement dans le cas de l'épuisement de glucose, mais aussi dans le cas de la pénurie de nitrate ou de Fe : dans ces deux pénuries, la sporulation s'amorce, puis avorte, tandis que le pH tombe et que les bâtonnets diminuent de taille ; l'addition de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 4  $\text{H}_2\text{O}$  : 0,1 g/l (environ  $550.10^{-6}$  M) à ce milieu, conduit au contraire à la formation de spores thermorésistantes.

Lorsque nous avons constaté la sporulation par omission de Zn, nous avons en même temps observé la nécessité du Ca (tableau III). Sans Ca, aucune spore ne se forme. Avec Ca :  $50.10^{-6}$  M,



TABLEAU III. — Influence de la pénurie de Ca sur la sporulation par pénurie de Zn; variant A.

Glucose initial : environ  $250.10^{-3}$  M 45 g/l).

Ca $10^{-6}$ M		DURÉE DES CULTURES	
		31 heures	55 heures
500	pH . . . . .	6,0	4,5
	Glucose g/l . . .	36,0	23,2
	Opacité . . . . .	5,5	7,7
	Examen . . . . .	<i>Sp. incl., quelques libes.</i> Quelques B. courts.	<i>Sp. libres.</i> Quelques B. courts.
50	pH . . . . .	6,0	5,4
	Glucose g/l . . .	33,0	14,0
	Opacité . . . . .	4,0	8,0
	Examen . . . . .	B. courts, ch. 1-2. Quelques <i>sp. incl.</i>	B. courts, ch. 1-2. Quelques <i>sp. libres.</i>
0	pH . . . . .	6,4	4,6
	Glucose g/l . . .	28,6	9,4
	Opacité . . . . .	8,2	10,5
	Examen . . . . .	B. courts, ch. 1-2.	B. courts, ch. 1-2.

quelques bactéries seulement sont aptes à former des spores. Avec Ca :  $500.10^{-6}$  M, la sporulation est presque complète.

C'est de cette expérience que nous avons déduit la concentration élevée de Ca :  $1.000.10^{-6}$  M, présente dans le milieu témoin.

III. L'EFFET DE LA PÉNURIE DE CALCIUM SUR LA SPORULATION PAR INSUFFISANCE D'AÉRATION; VARIANT B. — Nous avons cherché si le calcium, qui est nécessaire à la sporulation du variant A, provoquée par diverses pénuries, l'est aussi à la sporulation du variant B, provoquée par l'insuffisance d'aération.

Les cultures sont réalisées en flacons de 250 cm<sup>3</sup> avec divers volumes de milieu : nous rapportons ici les résultats obtenus avec le volume de 50 cm<sup>3</sup>, optimum pour la sporulation (tableau IV).

En présence de calcium, la croissance se poursuit jusqu'à épuisement du glucose ; mais bien avant ce stade, dès vingt-quatre heures, la sporulation est provoquée dans presque tous les germes par l'insuffisance d'aération ; à cent heures les spores formées, très réfringentes, résistent dix minutes à 80°.

En absence de calcium, la croissance est limitée, le milieu s'acidifie et le glucose n'est pas épuisé ; à vingt-quatre heures, il se produit une sporulation partielle, mais les spores formées sont peu réfringentes, et à cent heures elles sont presque toutes tuées après cinq minutes à 80°, et toutes après dix minutes.

TABLEAU IV. — Influence de la pénurie de Ca sur la sporulation par insuffisance d'aération ; variant B.

Glucose initial : environ 250  $10^{-3}$  (45 g/l).

Ca $10^{-6}$ M		DURÉE DES CULTURES		
		24 heures	54 heures	100 heures
2 000	pH . . . . .	6,0	6,45	8,4
	Glucose g/l . . . . .	21,5		0
	Opacité . . . . .	12,4	20,0	
	Examen . . . . .	<i>Sp. incl.</i> Quelques B. n , ch. 1.	<i>Sp. libres.</i> Quelques B.	
	Thermo-résistance.			Résistent 10 min. à 80°.
0	pH . . . . .	5,7	4,8	4,6
	Glucose g/l . . . . .	22,6		
	Opacité . . . . .	8,4	9,6	
	Examen . . . . .	B. courts. <i>S. incl.</i> <i>peu réfringentes.</i>	<i>Sp. libres peu réfring.</i> B. courts, ch. 2.	
	Thermo-résistance.			Tués après 5 min. à 80°.

Ainsi le calcium, sans lequel le métabolisme du variant B est dévié vers l'acidification, est bien nécessaire à la sporulation normale et à la thermorésistance des spores.

## DISCUSSION.

Les facteurs de sporulation que nous avons identifiés présentent dans leur variété le caractère commun de limiter la croissance : on peut donc se demander si la cause de la sporulation ne réside pas dans le ralentissement ou l'arrêt des divisions bactériennes [42].

Pourtant, il existe des pénuries de potassium, de magnésium ou de manganèse, qui limitent la croissance sans produire de sporulation. Pour repousser cette objection, il faut montrer que ces constituants sont eux-mêmes nécessaires à la sporulation, de sorte que les bacilles qui subissent une pénurie de l'un d'eux ne puissent sporuler sous l'effet d'aucun facteur connu.

De fait, nous constatons que les constituants perturbent ou réduisent la sporulation provoquée par l'épuisement du glucose, mais nous n'avons pu obtenir qu'elles l'annulent complètement. Il existe donc, dans les cultures, une hétérogénéité dont nous avons déjà eu des exemples ; et tout se passe comme si certains bacilles échappaient isolément à la pénurie du constituant nécessaire à la

sporulation, et restaient, de ce fait, aptes à sporuler, si le glucose, par exemple, vient à son tour à manquer.

Il reste donc possible que le facteur commun de sporulation, mis en œuvre par des pénuries variées en présence des constituants nécessaires, soit le ralentissement ou l'arrêt des divisions bactériennes.

#### CONCLUSIONS.

Dans des cultures agitées de *Bacillus megatherium*, nous avons cherché parmi les constituants du milieu synthétique dont la pénurie n'entraîne pas la sporulation ou n'entraîne qu'une sporulation partielle, s'il en est dont la présence est nécessaire à la formation des spores.

Lorsque l'épuisement du glucose est le facteur sporogène choisi, une pénurie simultanée de phosphate, ou de potassium, ou de magnésium, ou de manganèse, a pour effet de rendre inaptés à sporuler les bacilles qui ont souffert le plus de la pénurie de l'élément limitant. Cependant, par aucune de ces pénuries nous n'avons pu réaliser l'inhibition totale de la sporulation.

L'omission du calcium dans la formule du milieu, bien qu'elle n'ait pas d'effet sur le taux de croissance, empêche ou perturbe la sporogénèse : lorsqu'il se forme des spores, elles sont peu réfringentes, et beaucoup d'entre elles sont peu thermorésistantes.

La nécessité du calcium pour la sporulation, et spécialement pour la formation de spores thermorésistantes, est montrée également avec d'autres facteurs sporogènes : pénurie de nitrate, de fer ou de zinc dans les cultures du variant A ; aération limitante dans les cultures du variant B.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. BERTRAND. Ces *Annales*, 1912, **26**, 773-777.
- [2] J. CHARNEY, W. P. FISHER et C. P. HEGARTY. *J. Bact.*, 1951, **62**, 145-148.
- [3] H. R. CURRAN, B. C. BRUNSTETTER et A. T. MYERS. *J. Bact.*, 1943, **45**, 485-494.
- [4] J. W. FOSTER et F. HEILIGMAN. *J. Bact.*, 1949, **57**, 613-615.
- [5] N. GRELET. Ces *Annales*, 1950, **78**, 423-424.
- [6] N. GRELET. Ces *Annales*, 1951, **81**, 430-440.
- [7] N. GRELET. Ces *Annales*, 1952, **82**, 66-77.
- [8] N. GRELET. Ces *Annales*, 1952, **82**, 310-317.
- [9] G. KNAYS. *J. Bact.*, 1945, **49**, 473-493.
- [10] E. LEIFSON. *J. Bact.*, 1931, **21**, 331-356.
- [11] J. RÉGNIER, A.-R. PRÉVOT et S. LARTIGAUD. *C. R. Acad. Sci.*, 1945, **221**, 38-40.
- [12] A. ZIRONI et E. CALINFANTI. *Zentralbl. Bakt. I. Orig.*, 1943, **149**, 142-153.

# COMPARAISON DE SOUCHES BACTÉRIENNES RÉSISTANTES A DES ANTIBIOTIQUES AVEC DES SOUCHES SENSIBLES DE MÊME ESPÈCE (1)

par MIRKO BELJANSKI.

(Institut Pasteur. Laboratoire de Chimie biologique  
[professeur MACHEBOEUF].)

La découverte des antibiotiques pose de nombreux problèmes d'ordre biochimique et biologique. Le problème de la résistance bactérienne a fait l'objet de nombreuses recherches sur les conditions expérimentales permettant d'obtenir des souches résistantes aux toxiques ou aux antibiotiques, mais le point de vue biochimique du problème n'a pas été systématiquement abordé et l'on ignore encore quel est le processus qui est spécifiquement modifié dans les souches résistantes.

Dans notre travail nous avons essayé d'apporter quelques faits nouveaux d'ordre biochimique et biologique qui pourraient peut-être contribuer à faire connaître le déterminisme de la résistance.

Si l'on admet que chaque antibiotique agit spécifiquement sur un processus métabolique déterminé on peut, en effet, penser que la perte ou la transformation de ce processus métabolique entraîne une résistance spécifique à l'antibiotique correspondant.

Nous nous sommes proposé d'analyser le métabolisme des microbes résistants pour voir ce qui les différencie des microbes sensibles normaux de même espèce, puis de voir le comportement de cette souche vis-à-vis de certaines substances chimiques thérapeutiques différentes des antibiotiques. On sait que le fait d'être résistant à un antibiotique ne confère pas la résistance à un autre antibiotique. (La double résistance est possible [1].) Ceci laisse supposer que les processus de résistance aux divers antibiotiques ne sont pas identiques. Nous pourrions donc espérer déceler ces différences biochimiques entre les souches d'une même espèce, mais résistante chacune à un antibiotique différent.

(1) Une note préliminaire résumant les résultats obtenus pour *Staphylococcus aureus* a été publiée [2].

## I. — CAS DE LA STREPTOMYCINE

A. — ETUDES SUR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*OBTENTION D'UNE SOUCHE DE *Staphylococcus aureus* (OXFORD)  
RÉSISTANTE A LA STREPTOMYCINE.

Une souche normale de *Staphylococcus aureus* sensible à 4 µg de streptomycine par millilitre (titrage de sensibilité par la méthode des dilutions progressives) a fait l'objet d'une série de repiquages successifs sur milieu renfermant des quantités croissantes de streptomycine. L'expérience est conduite en milieu peptoné et glucosé. On obtient, en définitive, une souche capable de se développer abondamment en vingt-quatre heures en présence de 4 000 µg de streptomycine par millilitre.

Cette souche résistante conserve sa résistance pendant quatre ou cinq repiquages au moins sur milieu sans streptomycine, et ceci est très suffisant pour permettre nos essais. Avant d'ensemencer le milieu gélosé dans les boîtes de Roux, nous avons pratiqué deux repiquages de la souche résistante dans le milieu peptoné et glucosé sans streptomycine afin d'éliminer toute influence éventuelle de traces de streptomycine pouvant être apportées par l'inoculum.

Dans les expériences qui suivent, les cultures de *Staphylococcus aureus* « résistant » furent pratiquées sur des milieux exempts de streptomycine, constitués soit par des solutions de peptone et de glucose, soit par de la gélose ordinaire.

ETUDES COMPARATIVES DE LA CROISSANCE  
DE SOUCHES DE *Staphylococcus aureus*, STREPTOMYCINO-SENSIBLE  
ET STREPTOMYCINO-RÉSISTANTE.

Une étude préliminaire sur la croissance des deux souches de *Staphylococcus aureus* s'imposait avant l'analyse biochimique.

On sait, en effet, que la constitution chimique des microbes varie d'une façon sensible suivant qu'ils sont examinés à des phases diverses de leur prolifération.

Nos expériences ont été réalisées en milieu peptoné et glucosé. Deux cultures de *Staphylococcus aureus* prélevées à la dix-huitième heure, l'une provenant de la souche sensible, l'autre de la souche résistante, sont diluées au moyen du milieu peptoné de façon à être ramenées à la même densité optique. On commence une série de tubes avec la même quantité d'émulsion bactérienne de même densité optique. On suit d'heure en heure



la croissance à 37° pendant vingt-quatre heures par des lectures opacimétriques avec l'appareil de Meunier, écran orangé.

Les résultats sont exprimés par les courbes suivantes (fig. 1). Les abscisses correspondent au temps et les ordonnées aux résultats des lectures opacimétriques exprimés en divisions du

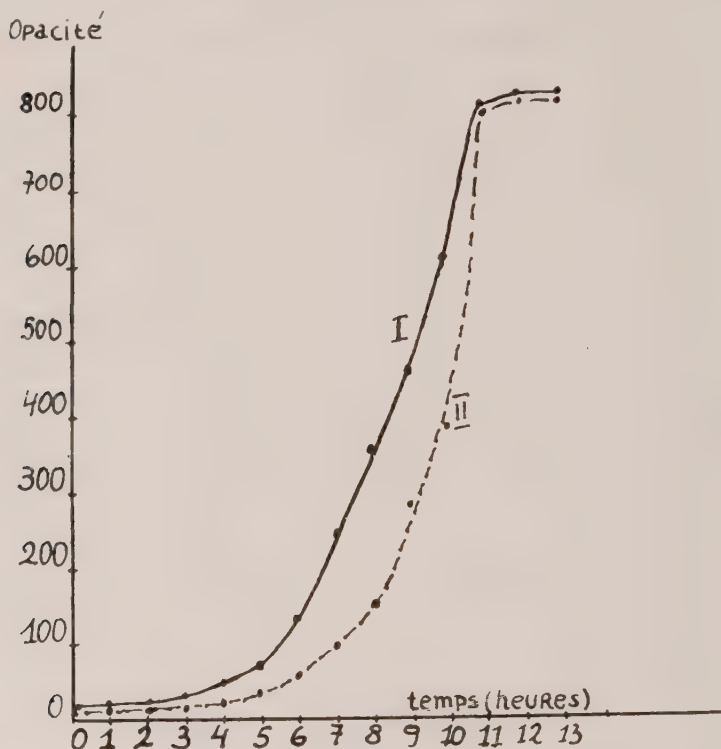


FIG. 1. — I, Courbe de croissance d'une souche de *Staphylococcus aureus* streptomycino-sensible; II, Courbe de croissance d'une souche de *Staphylococcus aureus* streptomycino-résistante.

tambour gradué de l'appareil de Meunier. Le chiffre obtenu pour le témoin (l'eau peptonée) est déduit.

Les courbes nous montrent que la phase de latence des souches résistantes est nettement plus longue que celle des souches sensibles, mais à cette exception près, les courbes de croissance sont presque identiques.

La phase de latence est un phénomène complexe. Beaucoup de théories ont été proposées à son sujet.

Monod [3] montre que la durée de la phase de latence varie

pour une espèce bactérienne donnée avec l'âge de l'inoculum. Les bactéries prélevées dans une culture en phase de latence ou bien dans une vieille culture constituent un inoculum pour lequel la phase de latence sera grande. Au contraire, des bactéries prélevées dans une culture en phase exponentielle de croissance constituent un inoculum pour lequel la phase de latence sera extrêmement brève ou pratiquement nulle. Pour Monod, par conséquent, la phase de latence est explicable par l'état physiologique des bactéries inoculées dans la culture. Monod pense aussi à l'influence de substances toxiques présentes dans les milieux de culture artificiels. Ces produits toxiques seraient détruits (ou inhibés) par les bactéries pendant leur phase de latence et c'est seulement après cette destruction que la culture suivrait son destin normal de croissance.

Il se peut aussi, croyons-nous, que les toxiques auxquels pense Monod soient peut-être simplement des métabolites des cellules qui ne croissent plus, c'est-à-dire des vieilles cultures qui constituent l'inoculum habituel. Les bactéries en phase de latence prolongée sont, en effet, des bactéries provenant directement ou indirectement de telles cultures. Ce serait seulement lorsque les bactéries mises dans un milieu nutritif neuf ont pu éliminer ces métabolites ou les métaboliser, que leurs conditions biologiques redeviendraient normales. Lorsque Monod constate l'existence d'une phase de latence pour un inoculum provenant d'une culture elle-même en phase de latence, il s'adressait, en somme, à des cellules d'une vieille culture qui n'avaient pas encore terminé l'élimination des métabolites gênants. La phase de latence ainsi observée est d'autant moins longue que l'inoculum était resté lui-même préalablement plus longtemps en latence.

L'hypothèse de Monod est très intéressante, mais elle n'est pas suffisante pour expliquer tous les faits expérimentaux. En effet, on a pu démontrer [4, 5] que pendant la phase de latence la constitution chimique des bactéries se modifiait progressivement dans le sens de l'accumulation de substances nécessaires au développement et en particulier d'acides nucléiques.

On peut penser que les acides nucléiques et surtout l'acide ribonucléique, indispensable aux synthèses protéiques pendant la prolifération cellulaire, sont fabriqués pendant la période de latence et doivent s'accumuler jusqu'à une concentration suffisante pour permettre ces synthèses.

#### ETUDES COMPARATIVES DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE SOUCHES DE *Staphylococcus aureus*, STREPTOMYCINO-SENSIBLE ET STREPTOMYCINO-RÉSISTANTE.

Les conclusions de nos études ci-dessus sur la croissance des souches résistantes et sensibles de *Staphylococcus aureus* nous

incitèrent à orienter nos premières analyses vers le domaine des acides nucléiques, et particulièrement de l'acide ribonucléique, dont on admet l'importance dans les synthèses protéiques [6, 7].

Gros et Machebœuf [9, 2, 10] ont montré que l'action de la streptomycine sur le métabolisme des bactéries se traduit plus particulièrement par des modifications profondes dans l'utilisation de l'acide ribonucléique et de ses dérivés, les mononucléotides.

Il est donc intéressant de rechercher si l'adaptation des microbes à la streptomycine ne s'accompagnerait pas de perturbations profondes dans le métabolisme des acides nucléiques.

ETUDE DU MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES  
CHEZ UNE SOUCHE DE *Staphylococcus aureus*  
RÉSISTANTE A LA STREPTOMYCINE  
ET CHEZ UNE SOUCHE SENSIBLE DE MÊME ESPÈCE.

La souche de *Staphylococcus aureus* résistante est la même que celle qui servit aux études sur la croissance exposées ci-dessus. Sa résistance était de l'ordre de 4 000  $\mu$ g de streptomycine par millilitre. La sensibilité de la souche normale, dont elle dérivait, était de l'ordre de 4  $\mu$ g par millilitre. Les expériences ont été conduites dans des boîtes de Roux, sur bouillon gélosé.

TECHNIQUES. — Deux séries de boîtes de Roux furentensemencées par des *inocula* de même masse provenant de cultures de dix-huit heures. Toutes les heures on a prélevé une boîte de la série résistante et une de la série sensible. Les bactéries furent récoltées (avec des billes de verre) et lavées deux fois avec de l'eau distillée refroidie. Les bactéries lavées sont mises en suspension dans de l'eau distillée. Sur 0,5 ml de suspension homogène, on dose l'azote total microbien. On prélève 1 ml de la suspension pour déterminer le poids sec et le reste est mis en présence d'une solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100. On laisse à la glacière pour assurer une bonne diffusion, dans la solution, des produits du métabolisme des acides nucléiques. On centrifuge (pendant quinze minutes à 2 000 g), puis on décante. On ajuste le volume à 10 ml avec une solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100.

Sur une partie aliquote du liquide on dose :

- 1° L'azote purique des nucléotides par la méthode de Kerr [41] ;
- 2° Les ions orthophosphoriques par la méthode de Machebœuf et Delsal [42].

Le culot séparé du liquide précédent est utilisé pour l'extraction des acides nucléiques d'après la méthode de Schneider (2) [43].

(2) Le culot de centrifugation traité par la méthode de Schneider est conservé, car il servira à doser l'azote protéique (voir plus loin).

L'acide ribonucléique est dosé suivant la technique de Mejbaum [14] modifiée par Albaum et Umbreit [15] en tenant compte du facteur de correction que nous avons précisé [16].

L'acide désoxyribonucléique est dosé par la méthode de Dische [17] en utilisant comme étalon une préparation d'acide thymonucléique très polymérisé obtenue suivant Hammarsten [18] et purifiée suivant Brederick [19].

### Résultats expérimentaux.

Nos résultats sont exprimés par les figures 2 et 3. Les abscisses correspondent aux durées de culture, tandis que les ordonnées

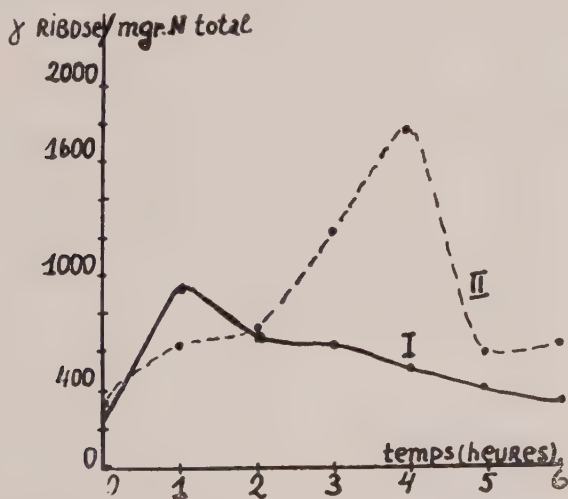


FIG. 2. — Teneur en ribose d'acide ribonucléique de *Staphylococcus aureus*.  
I, Souche streptomycino-sensible; II, Souche streptomycino-résistante.

correspondent respectivement aux teneurs en  $\mu\text{g}$  rapportées au milligramme d'azote total des bactéries.

Pour les deux souches étudiées on observe un accroissement de la teneur en acide ribonucléique, puis un maximum suivi d'un retour au chiffre initial. Mais l'accroissement est considérablement plus grand pour la souche résistante que pour la souche sensible et il est plus tardif.

En somme, chacune des souches accumule de l'acide ribonucléique et le maximum de cette accumulation se situe à la fin de sa période de latence. Le retard constaté pour la souche résistante correspond au retard de la terminaison de sa phase de latence.

Le fait prédominant est la disproportion considérable des teneurs en acide ribonucléique correspondant aux maxima.

Dans la souche résistante, le taux d'acide ribonucléique s'élève à une valeur si grande, qu'à l'époque du maximum, la teneur des cellules en cet acide représente 17 p. 100 de leur substance sèche, chiffre très surprenant mais vérifié avec soin par plusieurs séries d'expériences et corroboré par des expériences comparables sur

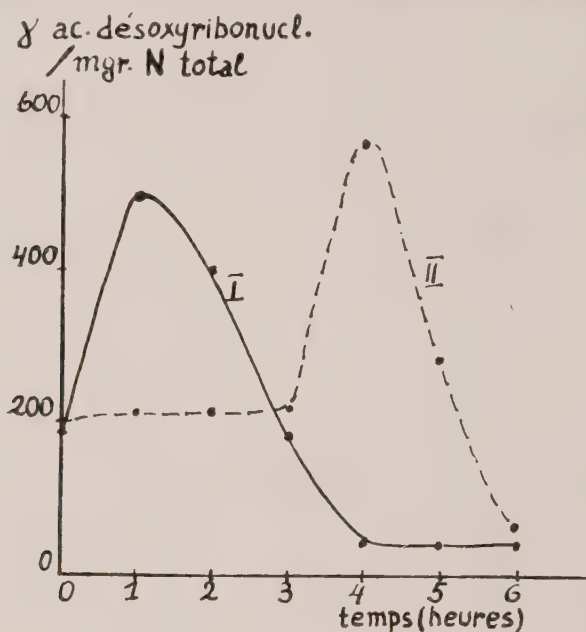


FIG. 3. — I, Courbe représentant la teneur en acide désoxyribonucléique chez une souche de *Staphylococcus aureus*, streptomycino-sensible; II, Courbe représentant la teneur en acide désoxyribonucléique chez une souche de *Staphylococcus aureus*, streptomycino-résistante.

des souches pénicillino-résistantes, dont les résultats seront publiés prochainement.

On voit que l'allure du phénomène est très comparable chez les souches streptomycino-sensibles et chez les souches streptomycino-résistantes, mais il existe une différence très nette dans la teneur en acide ribonucléique qui est deux à trois fois supérieure chez la souche résistante que chez la souche sensible. Cette accumulation massive d'acide ribonucléique constitue peut-être, chez la souche résistante, un processus de désintoxication vis-à-vis de l'antibiotique. Il faut se rappeler ici que l'acide ribonucléique est antagoniste de la streptomycine [20].



En ce qui concerne le métabolisme de l'acide désoxyribonucléique, au contraire, on constate que la souche de *Staphylococcus aureus* streptomycino-sensible synthétise cette substance aussi abondamment que la souche résistante pendant la phase de latence. Les concentrations maxima sont les mêmes. La seule différence est dans l'époque où se place le maximum.

On peut se demander si le retard dans la synthèse de l'acide ribonucléique a comme conséquence un retard dans le démarrage de la division cellulaire ou bien si, au contraire, c'est le retard du démarrage de la division qui est la cause première. Il nous est difficile d'aborder cette question avant d'avoir examiné d'autres étapes du métabolisme de l'acide ribonucléique.

ETUDE DU MÉTABOLISME DES NUCLÉOTIDES ACIDO-SOLUBLES  
CHEZ *Staphylococcus aureus*, SOUCHES STREPTOMYCINO-SENSIBLE  
ET STREPTOMYCINO-RÉSISTANTE.

Dans les cellules microbiennes, à côté des acides nucléiques à l'état polymérisé, il existe des dérivés de ces acides : 1° des mononucléotides [21] ; 2° des nucléosides ; 3° des bases libres puriques et pyrimidiques.

L'étude des produits de dégradation des acides nucléiques a été effectuée en nous inspirant des techniques mises au point par Boivin et Mesrobian [22]. Les nucléotides, les nucléosides et les bases puriques libres sont mis en solution dans de l'acide trichloracétique à 10 p. 100 à basse température, comme nous l'avons vu ci-dessus. L'azote, dans les nucléotides précipités, est dosé d'après la méthode de Kerr [41].

Résultats expérimentaux.

Nos résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  d'N purique par rapport au milligramme d'azote total microbien (fig. 4).

Dans le cas de *Staphylococcus aureus* souche sensible, on assiste au début à une augmentation de la teneur en mononucléotides ; cette augmentation est parallèle à la formation des acides nucléiques (voir courbe pour l'acide ribonucléique). Le maximum de l'accumulation en mononucléotides est atteint en même temps que pour l'acide ribonucléique. Donc, il y a, à côté de l'acide ribonucléique, un surplus des mononucléotides qui n'ont pas encore participé à la formation de l'acide ribonucléique ou qui en dérivent.

Une partie des mononucléotides est vraisemblablement utilisée par la formation des polynucléotides et par conséquent de l'acide ribonucléique, tandis que l'autre partie reste à l'état libre. La courbe représentant les mononucléotides a une allure tout à fait semblable à celle correspondant à l'acide ribonucléique. Les

ordonnées de la première ne sont que la moitié environ de celles de la seconde.

La courbe obtenue avec les souches sensibles pour les nucléotides reflète les variations dans le métabolisme de l'acide ribonucléique.

Dans le cas des souches résistantes elle s'élève à la même hauteur que la courbe obtenue pour les souches sensibles, le maximum est simplement déplacé vers la droite et correspond au

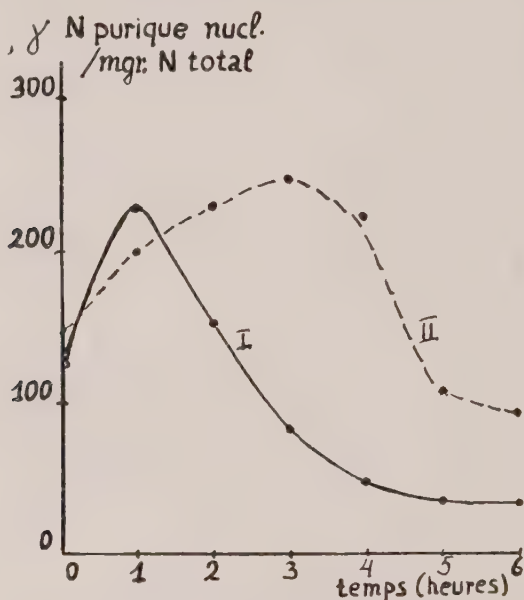


FIG. 4. — I, Courbe représentant l'azote purique nucléotidique chez *Staphylococcus aureus* sensible à la streptomycine; II, Courbe représentant l'azote purique nucléotidique chez *Staphylococcus aureus* résistant à la streptomycine.

Nos résultats sont exprimés en  $\mu$ g de phosphore par milligramme d'azote total microbien (fig. 5).

maximum de la courbe pour l'acide ribonucléique chez les mêmes souches résistantes.

Mais nous assistons ici à un déséquilibre considérable entre le taux en mononucléotides et le taux en acide ribonucléique de la souche résistante.

La teneur maxima des souches résistantes en mononucléotides est la même que pour les souches sensibles. Cependant les résistantes accumulent beaucoup plus d'acide ribonucléique. Ceci permet de penser que la polymérisation des ribonucléotides qui

conduit à l'acide ribonucléique s'effectue mieux chez les souches résistantes que chez les sensibles. Cette hypothèse trouve un appui dans le fait que le rapport quantitatif  $\frac{\text{acide ribonucléique}}{\text{ribomononucléotides}}$  augmente au cours de la croissance chez les souches résistantes, tandis qu'il décroît chez les sensibles.

ÉTUDE DU MÉTABOLISME DES IONS ORTHOPHOSPHORIQUES  
DE SOUCHES DE *Staphylococcus aureus*, STREPTOMYCINO-SENSIBLE  
ET STREPTOMYCINO-RÉSISTANTE.

On sait l'importance de la phosphorylation dans le métabolisme bactérien et combien varie, en particulier, la répartition

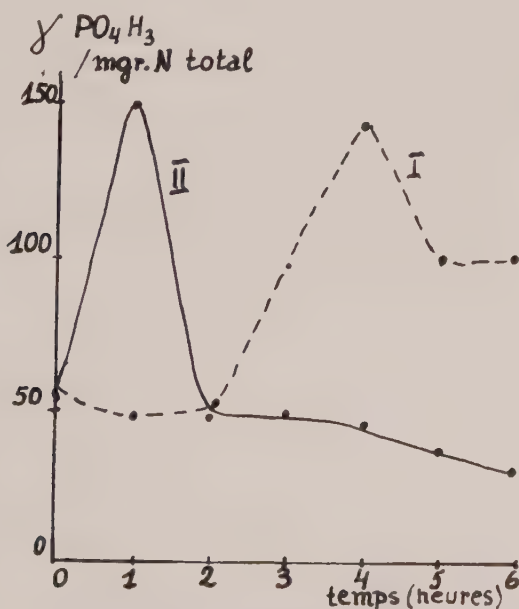


FIG. 5. — I, Courbe représentant l'évolution des ions orthophosphoriques chez *Staphylococcus aureus* streptomycino-résistant; II, Courbe représentant l'évolution des ions orthophosphoriques chez *Staphylococcus aureus* streptomycino-sensible.

Nos résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  de protéines par rapport au milligramme d'azote total microbien (fig. 6 et 7).

du phosphore cellulaire au cours de la croissance. Nous venons de considérer les variations du métabolisme des acides nucléiques et des nucléotides et nous avons démontré des différences particulièrement nettes dans le comportement des deux souches en ce

qui concerne les acides nucléiques. On sait que la teneur des bactéries en phosphates inorganiques dépend assez étroitement de l'utilisation des acides nucléiques et de leurs dérivés.

Nous avons suivi le sort des ions orthophosphoriques au cours de la croissance des deux souches, sensible et résistante, chez *Staphylococcus aureus*. Le dosage des phosphates a été effectué d'après la méthode de microdosages de Machebœuf et Delsal [12].

Les lectures sont faites au photomètre de Meunier avec l'écran orange (on déduit le chiffre obtenu pour le témoin blanc).

Les courbes obtenues pour les deux souches présentent chacune un clocher (fig. 5).

La situation des clochers est différente, mais leur hauteur est pratiquement identique. La montée de la courbe lorsque le clocher apparaît indique une période pendant laquelle les bactéries s'enrichissent considérablement en phosphates minéraux, et ceci se produit justement pour chacune des souches à la période où les bactéries accumulent les acides nucléiques. La baisse de la teneur en phosphates se situe de même à l'époque de la baisse de la teneur en acides nucléiques.

Ces faits sont assez curieux. On aurait pu penser que les phosphates nécessaires à la synthèse des acides nucléiques devaient s'accumuler avant que la synthèse nucléique atteigne sa plus grande vitesse.

#### ETUDE DES PROTÉINES CHEZ *Staphylococcus aureus*, SOUCHES STREPTOMYCINO-SENSIBLE ET STREPTOMYCINO-RÉSISTANTE.

La synthèse des protéines dans la vie des cellules est un problème parmi les plus difficiles et les plus importants de la biochimie. De nombreuses hypothèses ont été émises, mais leurs supports expérimentaux ne sont pas encore très grands (3).

Une série d'observations a montré qu'il y avait un lien entre la richesse de la cellule en acide ribonucléique et son aptitude de synthétiser des protéines [6, 7].

Caspersson [7] a proposé une très intéressante théorie au sujet de la synthèse des protéines dans les cellules. Les deux types d'acides nucléiques (désoxypentose et pentose nucléique) joueraient un rôle prépondérant dans cette synthèse. L'acide désoxypentose nucléique interviendrait dans la synthèse des protéines nucléaires au cours de la division cellulaire. Au contraire, l'acide pentose nucléique du nucléole et du cytoplasme jouerait un rôle dans la synthèse des protéines cytoplasmiques et des sécrétions protéiques. Cette théorie est basée sur des faits très intéressants

(3) Un exposé de ces théories sortirait du cadre du présent mémoire. Citons une récente mise au point sur ce sujet : Machebœuf [23].

observés en étudiant l'absorption des rayons ultra-violetes par les bases puriques des acides nucléiques dans les cellules. Il est extrêmement probable que les acides nucléiques soient un facteur très important des synthèses protéiques, mais aucune interpré-

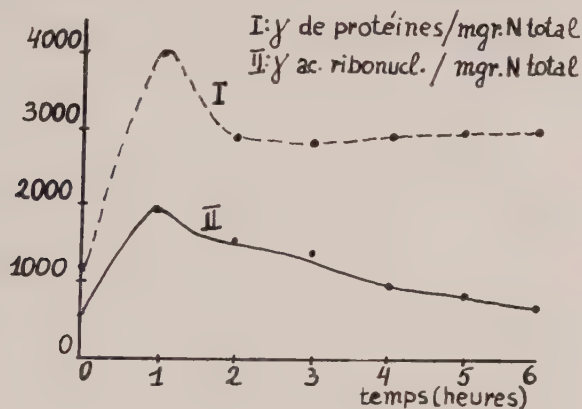


FIG. 6. — Souche de *Staphylococcus aureus* streptomycino-sensible.

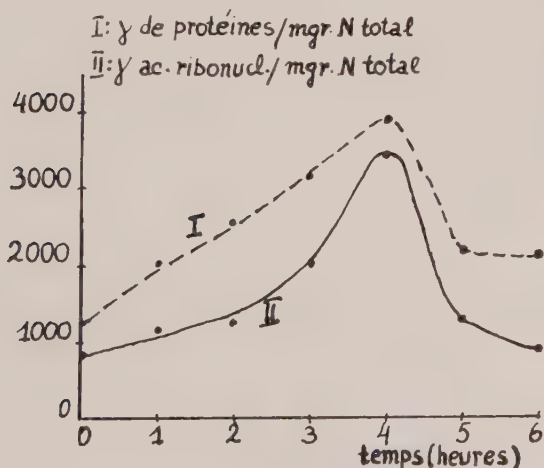


FIG. 7. — Souche de *Staphylococcus aureus* streptomycino-résistante.

tation satisfaisante n'a pu être proposée jusqu'ici au sujet du mécanisme biochimique de ce rôle des acides nucléiques.

Pour Brachet [6] ce sont des granules ribonucléoprotéiques cytoplasmiques qui sont facteurs de synthèses protéiques. Ces particules contiennent toujours une proportion appréciable de protéines spécifiques que synthétise chaque cellule. Brachet



considère ce fait comme un argument très puissant en faveur du rôle des granules ribonucléoprotéiques dans la synthèse des protéines. Cet auteur a constaté que la synthèse des protéines et celle de l'acide désoxyribonucléique sont accompagnées par un métabolisme intense de l'acide ribonucléique [24]. Cependant, l'acide ribonucléique n'est pas le précurseur de l'acide désoxyribonucléique [25].

Boivin [26], Malmgren et Heden [8] ont attiré l'attention sur la

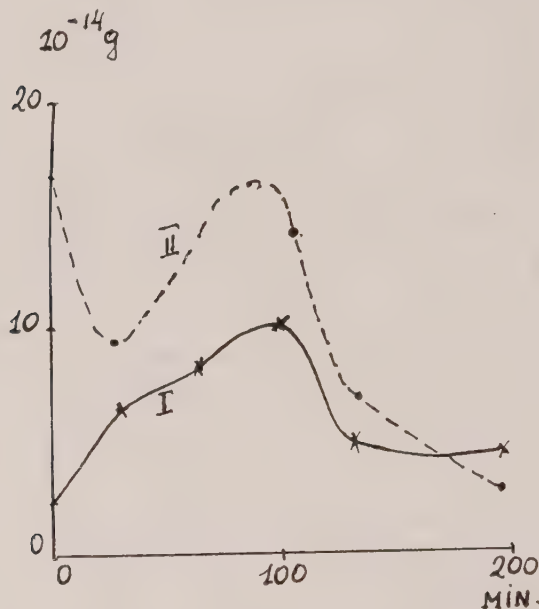


FIG. 8. — I, Teneur en acides nucléiques chez *Escherichia coli*;  
II, Teneur en protéines chez *Escherichia coli*.

richesse exceptionnelle en acide ribonucléique des bactéries, dont le pouvoir de multiplication est énorme.

Les travaux de Malmgren et Heden ont apporté des renseignements sur la synthèse des protéines au cours de la croissance microbienne [8]. Ces auteurs étudient chez des bactéries le métabolisme des nucléotides et des protéines au début de la phase de croissance exponentielle et pendant la phase de latence. Ils trouvent que la synthèse des acides nucléiques semble précéder celle des protéines. Ceci n'est pas parfaitement constant, comme l'ont prouvé certaines de nos expériences que nous allons exposer.

Les perturbations provoquées par la streptomycine dans le métabolisme de l'acide ribonucléique nous ont incité à entreprendre des recherches sur l'évolution protidique dans les souches sensible et résistante, en tenant compte des hypothèses qui relient l'acide ribonucléique à la synthèse des protéines. Pour cela, en première approximation, nous nous sommes contenté d'évaluer grossièrement l'azote protidique en dosant l'azote dans le résidu après deux épuisements à l'acide trichloracétique (méthode de Schneider).

Dans notre calcul, nous négligeons la très faible quantité d'azote polynucléotidique et lipidique qui persiste, peut-être, dans les corps microbiens après épuisement par l'acide trichloracétique.

En faisant la comparaison entre les deux courbes représentant l'évolution des protéines dans les souches sensible et résistante à la streptomycine, nous assistons à un phénomène très curieux en ce qui concerne les rapports entre les protéines et les acides nucléiques, spécialement dans la souche résistante. On n'observe pas l'harmonie remarquée par Caspersson et Brachet entre ces deux constituants de la cellule. En effet, dans les conditions de nos expériences, la souche résistante accumule des quantités considérables d'acide ribonucléique et cependant la synthèse de ses protéines conduit à une même teneur que pour la souche sensible. Nous observons donc un défaut d'harmonie entre les synthèses d'acides ribonucléiques et de protéines chez la souche résistante. Le fait est surprenant car il est en opposition avec les très intéressantes observations de Brachet dans les cellules animales.

#### B. — ETUDES SUR *ESCHERICHIA COLI*

Nous avons vu, dans le cas d'une espèce à Gram-positif (*Staphylococcus aureus*), que le métabolisme de l'acide ribonucléique différait pour les souches sensibles et les souches résistantes à la streptomycine. Nous avons constaté une accumulation massive d'acide ribonucléique chez la souche streptomycino-résistante avant la phase exponentielle de la croissance bactérienne. On pouvait se demander si cette propriété se retrouvait également pour les bactéries à Gram négatif. Nous avons donc entrepris l'étude de souches d'*Escherichia coli* sensible et résistante à la streptomycine. Les techniques analytiques que nous avons utilisées sont les mêmes que pour *Staphylococcus aureus*.

Une souche d'*Escherichia coli* B/r [27] résistante à la streptomycine a été envoyée à l'Institut Pasteur par le Dr Bertani (4).

(4) Dr Bertani, Dept. of genetics Cold Spring Harbor, Long Island, N. Y.

Cette souche, fortement résistante à la streptomycine (10 000 µg de streptomycine par millilitre), proliférait parfaitement bien sans et avec streptomycine ; elle était donc résistante mais non streptomycino-exigeante [28, 29, 30].

Les souches résistantes et les souches streptomycino-exigeantes obtenues à partir de souches sensibles forment des colonies, dont l'aspect est pratiquement identique à celui des souches sensibles. Cependant l'examen microscopique révèle des différences morphologiques : les cellules sont moins longues mais plus larges [31, 32, 33].

Nous avons effectivement constaté que nos germes résistants présentaient des modifications morphologiques notables. Les bâtonnets sont raccourcis environ deux fois et légèrement élargis.

#### ETUDE COMPARATIVE DE LA CROISSANCE DES SOUCHES SENSIBLE ET RÉSISTANTE D'*Escherichia coli*.

L'étude de la croissance a été conduite comme ci-dessus pour le Staphylocoque (milieu peptoné à 2 p. 100 et glucosé à 0,3 p. 100). La souche streptomycino-résistante a subi deux repiquages sans antibiotique avant d'être utilisée.

Les résultats sont exprimés par les courbes de la figure 9. Les abscisses correspondent au temps et les ordonnées aux résultats des lectures opacimétriques exprimées en divisions du tambour gradué de l'appareil de Meunier (témoins déduits).

Dans les conditions de notre expérience, les courbes montrent que :

1° La phase de latence de la souche résistante est nettement plus longue que celle de la souche sensible ;

2° La phase exponentielle pour la souche résistante se termine également plus tard et elle ne conduit pas à un rendement aussi élevé (5) ;

3° La phase exponentielle est suivie par une phase d'auto-lyse pour la souche sensible tandis qu'elle est suivie par une phase de croissance très ralentie, mais indiscutable, pour la souche résistante [métabolite toxique ou épuisement prématuré d'un élément nutritif] (6).

(5) Nous n'avons pas poursuivi l'expérience au delà de la dixième heure, car nous étions surtout intéressé par la phase de latence et la phase de croissance exponentielle.

(6) C'est volontairement que nous avons opéré l'étude de la croissance dans les milieux nutritifs peu concentrés en matières alimentaires. Ainsi la phase exponentielle se termine avant que des catabolites toxiques atteignent une concentration gênante.

Nos *inocula* dans toutes nos expériences sur la croissance provenaient des bactéries en culture prélevées à la dix-huitième heure. Dans le cas particulier d'*Escherichia coli*, ceux de la souche sensible étaient donc constitués par des germes en autolyse, tandis que ceux de la souche résistante étaient encore probablement en période de croissance ralentie. Ces différences influent peut-être sur la durée des phases de latence. Pour étudier ce problème il

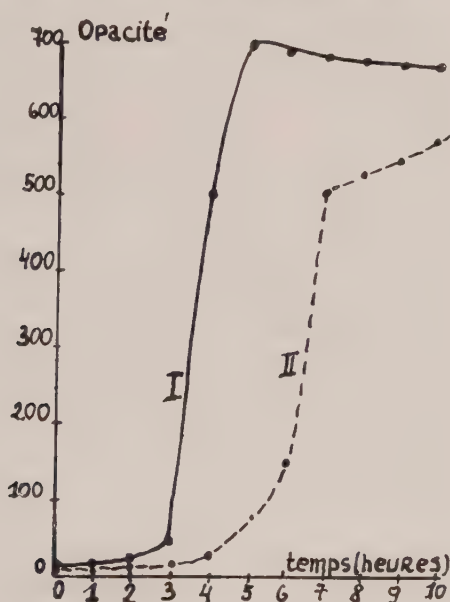


FIG. 9.

faudrait reprendre toute notre longue étude en étudiant systématiquement l'influence de l'« âge » de l'inoculum.

#### MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES DE SOUCHES D'*Escherichia coli*, SENSIBLE ET RÉSISTANTE A LA STREPTOMYCINE.

Nous avons cultivé les deux souches en aérobiose sur milieu gélosé dans les boîtes de Roux, puis opéré par les techniques décrites ci-dessus à propos de *Staphylococcus aureus* (page 84).

Nos résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  de ribose par rapport au milligramme d'azote total microbien (fig. 10).

Les courbes de la figure 10 montrent que la souche streptomycino-résistante accumule une proportion d'acide ribonucléique

notablement plus grande que la souche sensible. La différence n'est cependant pas aussi considérable que pour *Staphylococcus aureus* résistant à la streptomycine (7).

En ce qui concerne le métabolisme de l'acide désoxyribonucléique, des mononucléotides puriques, des protéines et des ions orthophosphoriques, nous n'observons pas de différences quantitatives entre les deux souches d'*Escherichia coli*, sensible

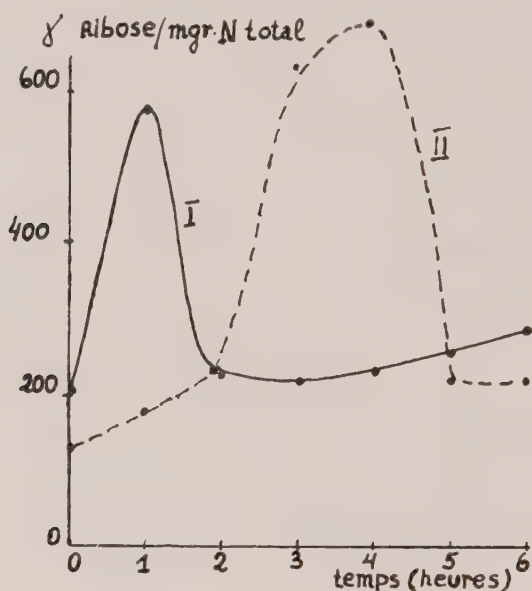


FIG. 10. — I, Courbe représentant la teneur en ribose d'acide ribonucléique chez une souche d'*Escherichia coli*, streptomycino-sensible; II, Courbe représentant la teneur en ribose d'acide ribonucléique chez une souche d'*Escherichia coli*, streptomycino-résistante.

et résistante à la streptomycine (fig. 11, 12, 13, 14). L'allure des courbes représentant l'évolution de ces substances en fonction du

(7) En comparant les résultats obtenus pour une espèce bactérienne à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) avec ceux obtenus pour une espèce à Gram négatif (*Escherichia coli*), nous observons que les germes à Gram positif résistants à la streptomycine accumulent davantage d'acide ribonucléique pendant la phase de latence que les germes à Gram négatif également résistants à la streptomycine. Cette étude a porté seulement sur deux espèces bactériennes; il serait intéressant de l'étendre à une série d'espèces pour savoir si ces conclusions ont un caractère de généralité.



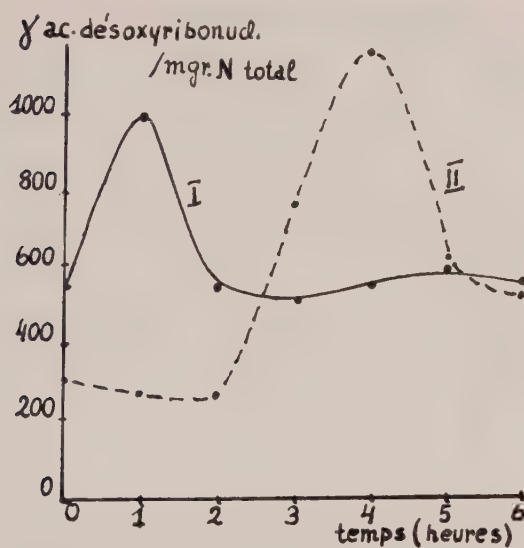


FIG. 11. — Souche de *E. coli*. I, Souche sensible; II, Souche résistante.

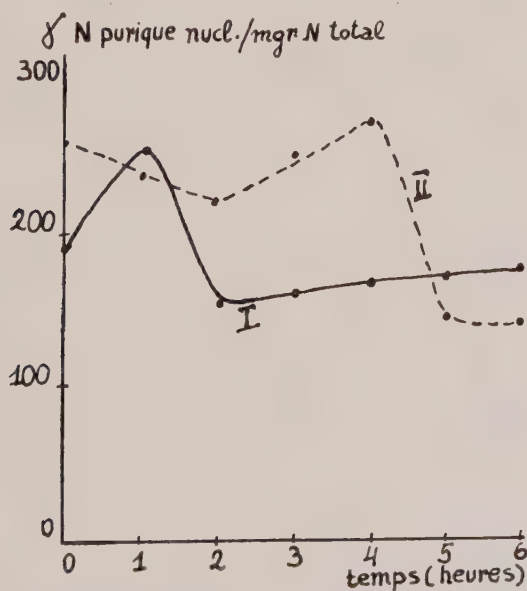


FIG. 12. — Souche de *E. coli*. I, Souche sensible; II, Souche résistante.

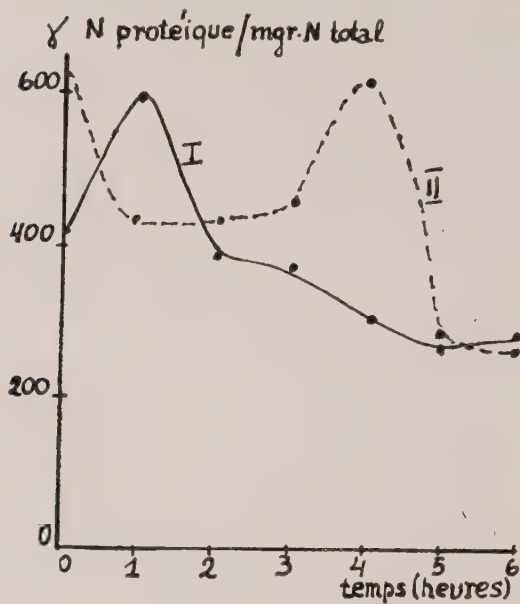


FIG. 13. — Souche de *E. coli*. I, Souche sensible; II, Souche résistante.

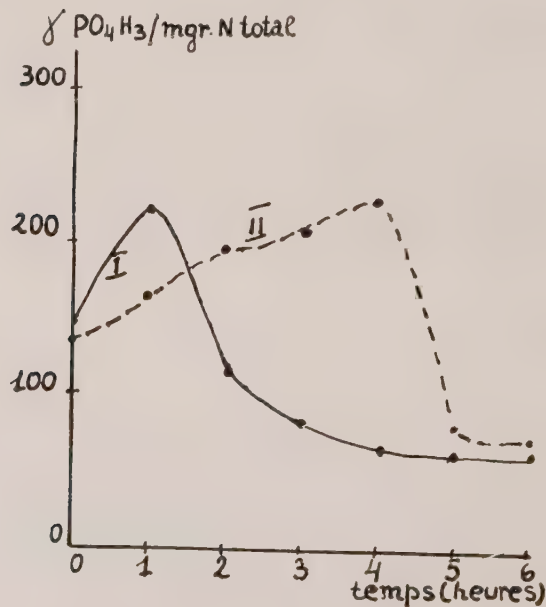


FIG. 14. — Souche de *E. coli*. I, Souche sensible; II, Souche résistante.

temps pour les deux souches est la même, lorsque la période de latence est terminée. Donc, indépendamment de l'inégalité des phases de latence, la seule différence entre les deux souches porte sur l'acide ribonucléique. Ceci est une confirmation de nos résultats antérieurs obtenus chez *Staphylococcus aureus*, résistant et sensible à la streptomycine.

Morse et Carter [34] ont étudié le métabolisme des acides nucléiques chez deux souches d'*Escherichia coli*, une souche normale B et une souche *résistante aux ultra-violets* provenant de B et désignée par B/r.

Ces auteurs ont utilisé comme traceur le phosphore radio-actif à l'état de phosphates et ont observé son rôle dans la synthèse des acides nucléiques. L'acide ribonucléique est surtout synthétisé pendant la phase de latence, juste avant le commencement de la phase exponentielle de multiplication des cellules bactériennes.

Morse et Carter trouvent que la souche B/r contient, à la fin de la phase de latence, trois à quatre fois plus d'acide désoxyribonucléique que la souche B normale d'*Escherichia coli*.

Bertani a bien voulu nous remettre une souche *résistante* à la streptomycine préparée à partir de la souche B/r.

Contrairement à ce qu'avaient observé Morse et Carter sur la souche B/r elle-même, nous trouvons ici que c'est l'acide ribonucléique qui est accumulé plus abondamment que l'acide désoxyribonucléique.

Nous devons donc conclure que la souche streptomycino-résistante obtenue par Bertani à partir de la souche B/r de Morse et Carter n'a plus les caractéristiques qu'avait la souche B/r elle-même. Les cultures répétées de B/r en présence de doses minimales de streptomycine ont conduit à l'obtention d'une souche streptomycino-résistante qui présente les caractéristiques que nous avons découvertes pour toutes les souches streptomycino-résistantes étudiées :

La phase de latence est prolongée.

L'acide ribonucléique s'accumule à la fin de cette phase notablement plus que l'acide désoxyribonucléique. Ce dernier acide ne s'accumule pas plus que dans les souches sensibles à la streptomycine.

En somme, la souche *résistante aux ultra-violets* de Morse et Carter, dite souche B/r, avait des caractères biochimiques très différents de ceux des souches streptomycino-résistantes de même espèce. Cependant, la souche streptomycino-résistante que Bertani a obtenue à partir de B/r présente les caractéristiques biochimiques habituelles des autres souches streptomycino-résistantes.

## Conclusions.

Des souches streptomycino-résistantes de deux espèces bactériennes, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, ont été comparées avec des souches de même espèce, mais sensibles à l'antibiotique.

1° Les courbes de croissance présentent une phase de latence plus prolongée pour les souches résistantes.

2° L'acide ribonucléique s'accumule, à la fin de la phase de latence, considérablement plus dans les souches résistantes que dans les souches sensibles.

3° Les autres constituants des bactéries qui furent étudiés (protéines, orthophosphates, mononucléotides à ribose, mononucléotides à désoxyribose et acide désoxyribonucléique) ne sont pas accumulés en excès par les souches résistantes. L'accumulation exagérée porte uniquement sur l'acide ribonucléique.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. M. POWELL et H. A. JAMIESON. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1942, **49**, 387.
- [2] F. GROS, M. BELJANSKI, M. MACHEBOEUF et M<sup>me</sup> F. GRUMBACH. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 875.
- [3] J. MONOD. *Actualités scientifiques et industrielles*, 1942, 911.
- [4] H. MALMGREN et HEDEN. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1947, **24**, 417.
- [5] H. B. LEVY, E. T. SKUTCH et H. L. SCHADE. *Arch. Bioch.*, 1949, **24**, 199.
- [6] J. BRACHET. *Actualités biochimiques*, 1951, 1.
- [7] T. CASPERSSON. *Symposium Soc. exp. Biol. Nucleic Acids*, 1947.
- [8] H. MALMGREN et HEDEN. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1947, **24**, 448.
- [9] F. GROS, M. MACHEBOEUF et S. JEULIN. *Ces Annales*, 1948, **74**, 368.
- [10] F. GROS, M. MACHEBOEUF, B. RYBAK et P. LACAILLE. *Ces Annales*, 1949, **77**, 246.
- [11] S. E. KERR. *J. biol. Chem.*, 1940, **132**, 151.
- [12] M. MACHEBOEUF et J.-L. DELSAL. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 116.
- [13] SCHNEIDER. *J. biol. Chem.*, 1945, **161**, 293.
- [14] W. MEJBAUM. *Zeitschr. Phys. Chem.*, 1939, **258**, 117.
- [15] H. G. ALBAUM et W. W. UMBREIT. *J. biol. Chem.*, 1947, **167**, 370.
- [16] M. BELJANSKI et M. MACHEBOEUF. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 174.
- [17] Z. DISCHE. *Microchemie*, 1930, **8**, 4.
- [18] E. HAMMARSTEN. *Biol. Zeitschr.*, 1924, **144**, 383.
- [19] H. BREDERECK. *Ergebn. Enzymforsch.*, 1938, **7**, 101.
- [20] H. VON EULER. *Ark. Kem. Miner. Geol.*, 1948, **26 A n° 6**, 1.
- [21] M. STEPHENSON. *Bacteriol. Metabolism*. Edition 1948.
- [22] A. BOVIN et L. MESROBEANU. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 302.
- [23] M. MACHEBOEUF. *Symposium sur les Protéines*. Rutgers University, 1951.

- [24] J. BRACHET. *Arch. Biol.*, 1937, **48**, 520.
- [25] S. S. COHEN. *J. biol. Chem.*, 1948, **174**, 281.
- [26] A. BOIVIN. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, **24**, 139.
- [27] E. M. WITKIN. *Genetics*, 1947, **32**, 221.
- [28] C. P. MILLER et M. BOHNHOFF. *Science*, 1947, **103**, 620.
- [29] C. P. MILLER et M. BOHNHOFF. *J. Bact.*, 1947, **54**, 167.
- [30] P. SCHAEFFER. *Ces Annales*, 1950, **78**, 624.
- [31] E. STRAUSS. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1947, **64**, 97.
- [32] A. K. SILVER et C. H. KEMPE. *J. Immunol.*, 1948, **57**, 270.
- [33] C. LEVADITI. La streptomycine et ses applications thérapeutiques, 1947.
- [34] M. L. MORSE et C. E. CARTER. *J. Bact.*, 1949, **58**, 317.

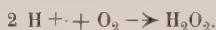


## FORMATION ET DÉCOMPOSITION DE L'EAU OXYGÉNÉE PAR LES BACTÉRIES ANAÉROBIES

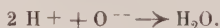
par M<sup>me</sup> GRUNBERG-MANAGO, J. SZULMAJSTER et C. DÉLAVIER.

(C. N. R. S. et Institut de Biologie physico-chimique,  
Service de Biochimie [professeur AUBEL], Paris.)

Le problème de la formation de l'eau oxygénée s'est posé tout d'abord chez les anaérobies stricts. On pensait, en effet, que sa solution expliquerait à elle seule le rôle nocif de l'oxygène pour la croissance de ces bactéries. L'un d'entre nous, dans une série de travaux antérieurs [1], a étudié en détail l'action de l'oxygène sur les anaérobies stricts. Mais, jusqu'à présent, personne n'a précisé la forme sous laquelle intervient l'oxygène. Il est admis depuis les travaux de Wieland, Warburg et Keilin que, lorsque l'oxygène n'est pas activé et sert simplement d'accepteur d'hydrogène, au même titre que le bleu de méthylène par exemple, il se forme de l'eau oxygénée :



Au contraire, lorsque l'oxygène est activé, il se forme de l'eau :



Il est possible, toutefois, que cette conception soit moins rigoureuse et qu'elle soit sujette à des modifications [2]. Mais actuellement, aucun travail reposant sur des bases suffisamment solides ne contredit cette théorie classique. Nous admettrons donc que si l'oxygène n'est pas activé, il se forme l'eau oxygénée.

On ne connaît rien du processus des réactions par lesquelles l'hydrogène s'unit à l'oxygène chez les anaérobies stricts. Il est possible, surtout chez *Cl. saccharobutyricum*, que les flavines servent d'intermédiaires :



comme c'est le cas pour le *B. delbrucki*, anaérobie facultatif riche en flavines (7 mg pour 100 g [3]). Or, les bactéries buty-

(1) DPN = Diphosphopyridine nucléotide.

riques sont des microorganismes encore plus riches en flavines (13,7 mg pour 100 g) et l'on connaît [1] le rôle important des flavines dans le métabolisme de ces bactéries et leur défense contre l'oxygène.

Mais dans tous les cas, soit par réaction directe de l'oxygène moléculaire avec l'hydrogène du substrat, soit par auto-oxydation des flavines, il doit se former de l'eau oxygénée. Elle a été mise en évidence précisément chez le *B. delbrücki* [4]. On a également pu la mettre en évidence dans une respiration forcée à l'air chez d'autres anaérobies facultatifs comme des races de pneumocoques ne possédant pas de catalase. Mais par contre, la recherche de l'eau oxygénée chez les anaérobies stricts dépourvus de catalase a toujours été négative, même si l'on aère fortement les suspensions de bactéries. On sait pourtant que dans ces conditions les anaérobies consomment de l'oxygène [5]. Or, le système classique activant l'oxygène (cytochrome-cytochrome-oxydase) est inconnu chez les anaérobies stricts. Ils sont même dépourvus de peroxydase et catalase.

L'oxygène peut-il être activé autrement que par un enzyme ? C'est ce que pense Yamafugi [2]. Pour lui, l'oxygène peut être activé sur la surface des protéines, mais cela demeure pour l'instant à l'état d'hypothèse. Les anaérobies stricts possèdent-ils donc un enzyme particulier capable d'activer l'oxygène ? A ce propos il faut citer quelques travaux [6, 7] relatifs à la *l*-amino-oxydase des bactéries. Cet enzyme catalyse l'oxydation de nombreux *l*-amino-acides sans qu'on puisse mettre en évidence la formation d'eau oxygénée comme avec la *l*-amino-oxydase des tissus.

Il est vrai que la recherche de traces d'eau oxygénée est très délicate. Elles sont en effet détruites facilement, par exemple par la lumière, certains milieux de culture (tryptique, peptoné ou contenant des substances SH) et des produits du métabolisme comme l'acide pyruvique.

Il faut tenir compte également du fait que l'eau oxygénée doit être formée à l'intérieur des cellules, tandis que tous les réactifs utilisés pour sa mise en évidence restent extérieurs à la cellule. Yamafugi [2], par exemple, recherchant l'eau oxygénée dans une levure chez laquelle il a bloqué la catalase par un inhibiteur, montre qu'elle ne peut être mise en évidence à cause de l'imperméabilité des cellules. L'irradiation des cellules de levure par des rayons U. V. change la perméabilité et permet au réactif d'entrer à l'intérieur des cellules, le dosage de l'eau oxygénée devient alors possible.

D'autre part, il se peut que l'échec de la mise en évidence de l'eau oxygénée chez les anaérobies stricts soit dû à ce que le peroxyde naissant est détruit par un mécanisme inhérent aux

bactéries. Ce doit être le cas de nombreux anaérobies. Douglas [8], Greisen et Gunsalus [9] ont montré que différentes souches de bactéries lactiques, ne contenant pas de catalase, oxydent l'alcool, le glucose ou le lactate sans accumuler d'eau oxygénée, bien que la respiration de ces bactéries soit régie par l'autoxydation des flavines. En ajoutant l'eau oxygénée, ils ont constaté que les bactéries sont capables de la décomposer en présence des substrats cités. *Streptococcus faecalis* [10], cultivé à l'air, peut également décomposer l'eau oxygénée en présence de substrat oxydable, alors que, cultivé en anaérobiose, il décompose à peine l'eau oxygénée. Dans tous les cas cités, le cyanure est sans action. D'après Seeley et Rio-Estrada [11], ce serait la forme réduite des riboflavines qui serait responsable de la destruction du peroxyde.

Toutes les expériences que nous venons de citer ont été faites avec les bactéries du groupe lactique, et il est certain que ces bactéries sont capables de décomposer l'eau oxygénée par un système peroxydasique non sensible au cyanure.

Il était intéressant d'étudier si la décomposition de l'eau oxygénée par les bactéries est un phénomène général. Nous avons recherché dans ce travail si d'autres anaérobies facultatifs et les anaérobies stricts sont capables de décomposer l'eau oxygénée par des mécanismes différents des systèmes peroxydasiques ou catalasiques connus.

#### TECHNIQUES.

I. Bactéries (2). — *E. coli* (souche Monod) a été cultivé à 37°, soit sur le milieu peptoné glucosé, soit sur le milieu ci-dessous :

$\text{PO}_4\text{KH}_2$ . . . . .	27,2 g
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ . . . . .	4 g
$\text{SO}_4\text{MG}_7\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	0,4 g
$\text{Cl}_2\text{Ca}$ . . . . .	0,01
$\text{SO}_4\text{Fe } 7 \text{ H}_2\text{O}$ . . . . .	0,0005
NaOH 10 N pour amener à . . . . .	pH 7.
Glucose . . . . .	10 g
Extrait de levure à 10 p. 100 . . . . .	10 cm <sup>3</sup>
Eau . . . . .	Q. S. P. 1 000 cm <sup>3</sup>

Le glucose et l'extrait de levure sont stérilisés à part et ajoutés stérilement au milieu.

*Cl. sporogenes* a été cultivé sur le milieu VF.

*Cl. welchii* a été cultivé sur le milieu VF glucosé à 5 p. 100.

(2) Toutes les souches proviennent de la collection de l'Institut Pasteur de Paris.

*Cl. saccharobutyricum* a été cultivé sur le milieu pomme de terre glucosé.

La suspension bactérienne a été faite suivant la technique usuelle [12].

L'anaérobiose est assurée soit par le vide, soit par barbotage d'azote purifié par passage dans un four à 500° en présence de tournure de cuivre.

*Préparation d'un broyat de bactéries.* — Une culture bactérienne de *Cl. sporogenes* de seize heures provenant de 1 l de milieu est centrifugée, lavée deux fois avec ClNa 9 p. 1 000, mise en suspension dans 15 cm<sup>3</sup> de tampon phosphate pH 7,4 et broyée quarante-cinq minutes avec de la poudre de verre dans l'appareil à agitation ultra-rapide de Towers. On élimine la poudre de verre et les débris cellulaires par dix minutes de centrifugation à 6 000 tours. On recentrifuge ensuite une demi-heure à 12 000 tours. On obtient un liquide surnageant clair L et un résidu marron foncé qui est mis en suspension dans un tampon phosphate 7,4 et homogénéisé à l'aide d'un agitateur mécanique. Cette suspension est appelée R. Toutes les opérations sont effectuées à froid.

*Dosages.* — L'élimination du fer a été effectuée par la méthode indiquée par Bard et Gunsalus [13] et son dosage par colorimétrie avec l' $\alpha\alpha$  dipyridyl au spectrophotomètre de Beckman à 525  $\mu$ .

Le dosage de l'eau oxygénée a été réalisé soit chimiquement par la méthode de Treadwell, soit par la catalase préparée par la méthode de Keilin [14].

La détermination de la quantité d'eau oxygénée provoquant chez les anaérobies stricts un arrêt réversible ou irréversible a été faite dans l'appareil de Warburg. C'est également dans cet appareil qu'ont été faites la plupart de nos expériences sur la formation et la décomposition d'eau oxygénée par *E. coli* en présence d'inhibiteurs de la catalase. Pour calculer la quantité d'eau oxygénée décomposée par le système non catalasique de *E. coli*, on procède de la manière suivante : on dose chimiquement la quantité totale d'eau oxygénée disparue dans chaque cupule de Warburg. Du chiffre obtenu on retranche la quantité d'eau oxygénée disparue par l'activité catalasique résiduelle, la catalase n'étant pas bloquée à 100 p. 100 par les inhibiteurs employés. L'activité catalasique résiduelle est mesurée pour chaque cupule par l'oxygène dégagé dans les cinq premières minutes après addition d'eau oxygénée. Le dosage n'est valable que s'il est fait dans les premières minutes. Par la suite, l'oxygène dégagé peut être consommé par les bactéries, ce qui fausse les résultats. L'activité déshydrogénasique a été mesurée par la technique de Thunberg.

Les mesures de densité bactérienne ont été faites par opacité avec l'électrophotomètre de Meunier et sont exprimées en poids sec d'après une courbe standard.

#### EXPÉRIENCES.

I. *Anaérobies facultatifs*. — Nous n'avons jamais pu mettre en évidence des traces d'eau oxygénée lors de l'oxydation du glucose par une suspension de *E. coli* dans un tampon phosphate en présence d'un inhibiteur de la catalase (azoture, cyanure ou hydroxylamine) même en aérobiose forcée. Pourtant, en présence d'azoture, la consommation d'oxygène, loin d'être inhibée, est au contraire fortement exaltée, et on ne connaît pas d'activateur d'oxygène fonctionnant en présence de cet inhibiteur. Les résultats sont les mêmes, quelles que soient les conditions de culture de *E. coli*, aérobiose ou anaérobiose. Au cours de l'oxydation du succinate en présence de l'hydroxylamine, on a pu doser de faibles quantités d'eau oxygénée. Mais ici encore, la quantité d'eau oxygénée trouvée est toujours de beaucoup inférieure à celle devant se former théoriquement par rapport à l'oxygène consommé (3). Des résultats analogues sont observés si les expériences sont faites avec le broyat des bactéries (suspension R ou liquide L).

Il n'a pas été possible non plus de mettre en évidence l'eau oxygénée pendant la croissance de *E. coli* à l'air en présence de cyanure, mais dans ces conditions il se peut, comme Broh-Khan et Mirsky [15] l'ont observé, que seul le système anaérobie de *E. coli* fonctionne ; il n'y aurait donc pas consommation d'oxygène et, par suite, pas de formation d'eau oxygénée. Cependant, même lorsque nous restaurons le système aérobie de *E. coli* en ajoutant du bleu de méthylène (la catalase étant maintenue bloquée par le cyanure), nous ne trouvons pas d'eau oxygénée, contrairement à Broh-Khan et Mirsky, tout en constatant l'arrêt de croissance signalé par ces auteurs.

On pouvait supposer que le fait que nous n'ayons pu mettre en évidence de l'eau oxygénée dans des conditions décrites est dû à la décomposition de celle-ci par un système différent de celui de la catalase.

Nous avons pensé tout d'abord que l'hydrogène formé au cours du métabolisme doit pouvoir réduire le peroxyde  $H_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O$ . En effet, *E. coli* possède une hydrogénase très active, l'azoture de sodium n'inhibe pas cette diastase [16]. Si l'on ajoute de l'eau

(3) En présence d'hydroxylamine et de succinate, il se produit une consommation d'oxygène par *E. coli*, l'hydroxylamine ne bloquant jamais totalement l'oxydation du succinate.



oxygénée à une suspension de *E. coli* en présence d'azoture de sodium qui bloque la catalase, avec de l'hydrogène moléculaire comme seul substrat, l'eau oxygénée est décomposée, environ 30  $\mu\text{g}$  par milligramme de bactéries, et l'on observe une consommation d'hydrogène correspondant à peu près à la quantité d'eau oxygénée décomposée. Théoriquement, pour décomposer 30,6  $\mu\text{g}$ , il faut 20  $\text{mm}^3$  d'hydrogène ; or, on observe une consommation d'hydrogène de 17  $\text{mm}^3$  (voir tableau I) alors que l'hydrogène moléculaire, en absence de bactéries, ne décompose pas l'eau oxygénée.

TABLEAU I. — Action de l'hydrogène dans la décomposition d'eau oxygénée par *E. coli*.

Chaque cupule de Warburg contient :

1  $\text{cm}^3$  suspension bactérienne correspondant à 5 mg de poids sec, 0,2  $\text{cm}^3$  azoture de sodium M/300 conc. fin. pour bloquer la catalase (v. Techniques), 0,5  $\text{cm}^3$   $\text{H}_2\text{O}_2$  correspondant à 220  $\mu\text{g}$ , complété à 2,5  $\text{cm}^3$  avec tampon phosphate pH 6,8 ; 0,2  $\text{cm}^3$  NaOH à 20 p. 100 pour absorber le  $\text{CO}_2$ .

Atmosphère d'hydrogène ou d'azote.

Les chiffres sont exprimés pour 1 mg de bactéries.

	ATMOSPHÈRE d'hydrogène	ATMOSPHÈRE d'azote
Absorption de gaz en $\text{mm}^3$ . . . . .	17,3	0
Décomposition d' $\text{H}_2\text{O}_2$ par un mécanisme différent de la catalase en $\mu\text{g}$ . . . . .	30,6	4

Mais les résultats du tableau II montrent que, même lorsqu'il ne se produit pas de dégagement d'hydrogène au cours du métabolisme (4) ou lorsque son hydrogénase est bloquée par le cyanure, *E. coli* est cependant capable de décomposer l'eau oxygénée en présence d'un substrat.

Il est exclu que l'eau oxygénée soit décomposée par un produit du métabolisme comme l'acide pyruvique : en présence de succinate il ne se forme pratiquement pas d'acide pyruvique [12] et il y a décomposition d'eau oxygénée.

La décomposition est indépendante des conditions de culture, aérobie ou anaérobie. Les cellules seules ou en présence d'un substrat non métabolisé décomposent à peine le peroxyde. Au-dessous d'une certaine concentration en eau oxygénée (10 mg p. 100), la quantité décomposée ne dépend que du substrat et de la quantité de bactéries en présence. Pour un substrat

(4) Dans un précédent mémoire [12], il a été démontré que l'azoture de sodium bloque le dégagement d'hydrogène en anaérobie, de *E. coli*.

TABLEAU II. — Eau oxygénée décomposée par le système non catalasique de *E. coli* (par milligramme de bactéries en poids sec).

Chaque cupule de Warburg contient :

1 cm<sup>3</sup> de suspension bactérienne correspondant à 4 mg de poids sec, 0,2 cm<sup>3</sup> d'inhibiteur, 0,5 cm<sup>3</sup> de substrat, 0,2 cm<sup>3</sup> d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> correspondant à 250 µg; complété à 2,5 cm<sup>3</sup> avec tampon phosphate M/15 pH 6,8, 0,2 cm<sup>3</sup> NaOH 20 p. 100 pour absorber le CO<sub>2</sub>.

L'eau oxygénée et l'inhibiteur sont ajoutés après dix minutes d'équilibre.

On indique ici les concentrations finales.

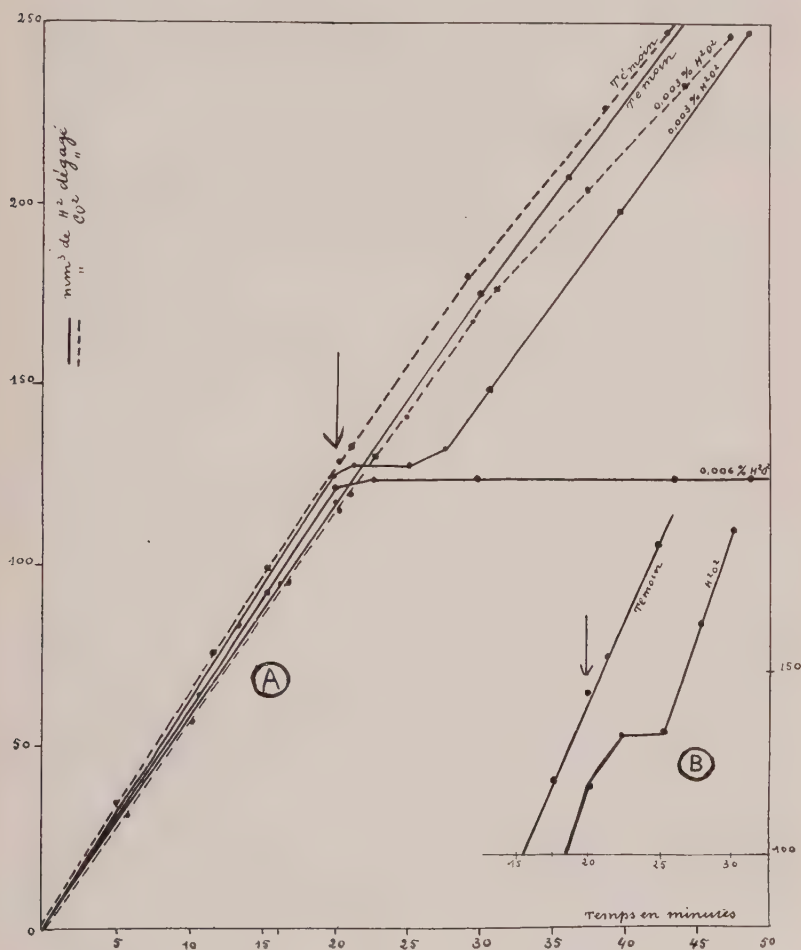
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> DÉCOMPOSÉE en µg		
		Cyanure (M/100)	NH <sub>2</sub> OH (M/1 000)	N Na (M/300)
Bactéries seules . . . . .	Aérobiose.	5	5	2
Bactéries + succinate (M/60) . . . . .			16,6	14
Bactéries + glucose (M/90) . . . . .		22	27	25
Bactéries déficientes en Fe + glucose M/90 . . . . .				41
Bactéries seules . . . . .	Anaérobiose.		7	6
Bactéries + succinate M/60 . . . . .			16	16
Bactéries + glucose M/90 . . . . .				25

donné, la quantité décomposée est proportionnelle à la quantité de bactéries.

Il existe donc chez *E. coli* un système non catalasique fonctionnant en aérobiose et anaérobiose capable de décomposer l'eau oxygénée. Ce système n'est sensible ni à l'azoture, ni au cyanure. De plus, il n'est pas affecté lorsque les bactéries ont été cultivées sur un milieu déficient en fer (100 µg par litre au lieu de 900 µg dans le milieu normal), alors que la catalase bactérienne est fortement inhibée.

II. *Anaérobies stricts*. — Les anaérobies stricts ne pourraient-ils pas, comme *E. coli*, décomposer l'eau oxygénée par l'hydrogène activé ? *Cl. welchii* possède en effet une hydrogénase très active. Lorsque, à une suspension de ces bactéries dans un tampon de phosphate renfermant du glucose, en atmosphère d'azote, on ajoute, dix minutes après le début du dégagement des gaz, de faibles quantités d'eau oxygénée, on constate immédiatement un arrêt de la production d'hydrogène, tandis que le gaz carbonique continue à se dégager (voir fig. 1 et tableau III). Au bout de quelques minutes, la production d'hydrogène reprend avec une vitesse égale à celle du témoin. La quantité d'eau oxygénée provoquant cet arrêt est environ de 300 µg pour 100 cm<sup>3</sup> par milligramme de bactéries. La quantité d'hydrogène manquant par rapport au témoin est sensiblement égale à la quantité nécessaire

pour décomposer l'eau oxygénée (voir tableau III). Dans l'expérience résumée dans le tableau III, il a disparu 22 mm<sup>3</sup> d'hydrogène dans les cinq minutes qui suivent l'addition de 36,8 µg



Action de l'eau oxygénée sur le dégagement d'hydrogène et d'anhydride carbonique par *Cl. saccharobutyricum* (courbes A) et *Cl. welchii* (courbes B). La flèche indique le moment d'addition de l'eau oxygénée ou de l'eau.

d'eau oxygénée. Or, pour décomposer cette quantité, il faut théoriquement 24 mm<sup>3</sup> d'hydrogène. Il est donc vraisemblable que l'hydrogène disparu a été utilisé pour décomposer l'eau oxygénée. Quand celle-ci est décomposée, le métabolisme reprend

TABLEAU III. — Action de l'eau oxygénée  
sur *Cl. welchii* et *Cl. saccharobutyricum* en présence de glucose.

Chaque cupule de Warburg contient :

1 cm<sup>3</sup> de suspension bactérienne correspondant à 5 mg de poids sec pour *Cl. welchii* et 1 mg pour *Cl. saccharobutyricum*, 0,5 cm<sup>3</sup> de glucose M/90 conc. fin, 0,2 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> correspondant à 36,8 µg pour *Cl. welchii* et 8 µg pour *Cl. saccharobutyricum* ou 0,2 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O pour le témoin, complété à 2,5 cm<sup>3</sup> avec tampon phosphate M/15 pH 6,8, 0,2 cm<sup>3</sup> NaOH à 20 p. 100 ou 0,2 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O suivant que le CO<sub>2</sub> est absorbé ou non.

L'eau oxygénée est ajoutée 20 minutes après le début du dégagement d'hydrogène.

TEMPS  en minutes	MILLIMÈTRES CUBES d'hydrogène dégagé				MILLIMÈTRES CUBES de CO <sub>2</sub> dégagé			
	<i>Cl. welchii</i>		<i>Cl. sacch.</i>		<i>Cl. welchii</i>		<i>Cl. sacch.</i>	
	Témoin	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Témoin	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Témoin	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Témoin	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
10			58	64			64	57
20	146	117	117	126	110	86	126	115
	on ajoute H <sub>2</sub> O ou H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .							
22	154	133		132	110	110		
25	184	133	136	127	166	146	153	142
30	225	165	175	145	224	208	183	171

normalement. Dans les mêmes expériences faites avec *Cl. saccharobutyricum*, Aubel, Rosenberg et Szulmajster [17] ont constaté, en ajoutant l'eau oxygénée, un arrêt immédiat de la production d'hydrogène, tandis que le gaz carbonique continue à se dégager. Après un temps d'arrêt, qui peut être très court si la quantité d'eau oxygénée est faible, le dégagement d'hydrogène reprend avec une vitesse égale à celle du témoin (voir fig. 1). Le dosage final montre que dans les deux cas l'eau oxygénée a complètement disparu. La quantité d'hydrogène manquant par rapport au témoin est toujours plus grande que celle nécessaire pour décomposer l'eau oxygénée ajoutée (tableau III) ; dans cette expérience il a disparu, dans les cinq minutes qui suivent l'addition d'eau oxygénée, 18 mm<sup>3</sup> d'hydrogène, le dégagement de gaz carbonique n'étant pas modifié. Or, pour décomposer la quantité d'eau oxygénée ajoutée : 8 µg, il suffit de 5 mm<sup>3</sup> d'hydrogène. Il n'existe pas, comme chez *Cl. welchii*, un rapport stoechiométrique entre l'hydrogène disparu et l'eau oxygénée décomposée ; ici il n'y a pas intervention directe de l'hydrogène.

Enfin, à partir d'une certaine concentration en eau oxygénée, l'arrêt de la production d'hydrogène est définitif, l'eau oxygénée ayant aussi complètement disparu. Il y a donc une concentration en

eau oxygénée provoquant un arrêt réversible d'hydrogène et une concentration provoquant un arrêt irréversible.

Les concentrations d'eau oxygénée pour les limites réversibles et irréversibles sont fonction de l'âge et de la quantité de bactéries. Pour 1 mg de bactéries (en poids sec) âgées de 16 heures, la limite de réversibilité est atteinte avec 300-400  $\mu\text{g}$  p. 100, celle de l'irréversibilité avec 550-650  $\mu\text{g}$  p. 100 (tableau IV).

TABLEAU IV. — Quantités d'eau oxygénée nécessaires pour obtenir un arrêt réversible ou irréversible du dégagement d'hydrogène chez *Cl. saccharobutyricum*.

Mêmes conditions que celles du tableau II.

QUANTITÉ DE BACTÉRIES en milligramme de poids sec	QUANTITÉ D' $\text{H}_2\text{O}_2$ en $\mu\text{g}$ pour la limite réversible par milligramme de bactéries	QUANTITÉ D' $\text{H}_2\text{O}_2$ en $\mu\text{g}$ pour la limite irréversible par milligramme de bactéries
1,2	6,6	10
1,36	6	12
1,45	5,5	11
0,59	6,8	13

L'eau oxygénée agit chez *Cl. saccharobutyricum* sur une ou plusieurs substances responsables du dégagement d'hydrogène à partir du glucose et de ses produits de dégradation, suivant un mécanisme tel que la fixation d'un équivalent d'oxygène donne une combinaison réversible, celle de deux équivalents d'oxygène une combinaison irréversible.

Chez *Cl. welchii* également, il existe des substances extrêmement sensibles à l'eau oxygénée. On peut le montrer en plaçant les bactéries dans des conditions telles que l'eau oxygénée ne puisse être décomposée par l'hydrogène actif formé à partir du substrat, c'est-à-dire en ajoutant le peroxyde avant le glucose. Dans ces conditions, on n'observe jamais de dégagement d'hydrogène à partir de ce substrat, même si la concentration de l'eau oxygénée est inférieure à celle de la limite réversible.

Nous avons recherché chez *Cl. saccharobutyricum* et *Cl. welchii*, parmi les enzymes responsables du dégagement d'hydrogène, ceux qui sont sensibles à l'eau oxygénée. Nous avons été amenés ainsi à étudier l'action de l'eau oxygénée sur les déshydrogénases. Les expériences ont montré que, pour 1 mg de bactéries, avec la concentration de 300  $\mu\text{g}$  pour 100  $\text{cm}^3$ , toutes les déshydrogénases étudiées sont inhibées. Il faut diminuer la concentration jusqu'à 100  $\mu\text{g}$  d'eau oxygénée pour 100  $\text{cm}^3$  pour distinguer, parmi les déshydrogénases, celles qui sont le



plus sensibles : seule la formico-déshydrogénase est complètement inhibée, alors que les autres déshydrogénases le sont plus ou moins (tableau V). L'eau oxygénée n'influe pas sur la décoloration du bleu de méthylène par les bactéries en présence d'acide pyruvique ou d'hydrogène. Mais on ne peut conclure que la pyruvico-déshydrogénase et l'hydrogénase sont insensibles à l'eau oxygénée, car le peroxyde pourrait être décomposé par l'hydrogène actif ou l'acide pyruvique avant d'agir sur les déshydrogénases.

TABLEAU V. — Action de l'eau oxygénée sur les déshydrogénases de *Cl. welchii*.

Chaque tube de Thunberg contient :

1 cm<sup>3</sup> de suspension bactérienne correspondant à 6 mg de poids sec, 0,5 cm de substrat, 0,5 cm<sup>3</sup> de bleu de méthylène M/10 000, 0,2 cm<sup>3</sup> d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> correspondant à 14,7 µg; complété à 2,5 cm<sup>3</sup> avec du tampon phosphate M/15 pH 6,8.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le substrat et le bleu de méthylène se trouvent dans la même branche et sont ajoutés à la suspension bactérienne après dix minutes d'équilibre.

On indique ici les concentrations finales :

	TEMPS DE DÉCOLORATION	
	Sans H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Avec H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Bactéries seules . . . . .	∞	∞
Glucose M/90 . . . . .	1"	5'
Lactate M/50. . . . .	1"	25'
Alcool éthylique M/15 . . . . .	1"	18'
Formiate M/60 . . . . .	8'	∞

L'hydrogène actif n'est pas le seul moyen que possèdent les anaérobies stricts pour décomposer l'eau oxygénée. On a remarqué, au cours des expériences, qu'en ajoutant l'eau oxygénée à une suspension de *Cl. saccharobutyricum* ou *Cl. sporogenes* en absence de tout substrat, en anaérobiose, celle-ci disparaît très rapidement. On observe une décomposition moyenne (en une demi-heure) de 20 µg par milligramme de poids sec bactérien (150 µg par milligramme d'azote bactérien) pour *Cl. sporogenes*, et 87 à 185 µg par milligramme de bactéries pour *Cl. saccharobutyricum* (tableau VI). La quantité d'eau oxygénée décomposée est la même, que les bactéries aient été cultivées sur un milieu normal ou sur un milieu déficient en fer (5) (0,18 mg Fe par litre au lieu de 4 mg). Le cyanure n'a d'ailleurs aucun effet.

(5) *Cl. sporo.* et *Cl. sacch.* peuvent pousser sur un milieu déficient en fer en présence d'hydrogène activé par le noir de platine [18].

TABLEAU VI. — Décomposition de l'eau oxygénée par *Cl. sporogenes* et *Cl. saccharobutyricum*.

1 cm<sup>3</sup> d'eau oxygénée correspondant à 307 µg, 5 cm<sup>3</sup> de suspension de *Cl. sporogenes* ou de *Cl. saccharobutyricum*, complété à 10 cm<sup>3</sup> avec tampon phosphate M/15 pH 7, agité en anaérobiose à 37° : une heure.

	POIDS sec en milligrammes	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> décomposée	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> décomposée par milligramme de bactéries en µg
<i>Cl. sporogenes</i> . . . . .	9,96 4,93	193 99	19 20
<i>Cl. sporogenes</i> déficient en Fe. .	6,45	156	24
<i>Cl. saccharobutyricum</i> . . . . .	3,2 1,3	279 240	87 185

Le système, pour une part, est thermolabile ; les bactéries tuées par la chaleur décomposent une quantité d'eau oxygénée plus faible que les bactéries vivantes.

Nous nous sommes assurés qu'il ne s'agit pas là d'une simple action physique qu'exercerait une protéine quelconque sur l'eau oxygénée. C'est seulement en présence de protéines renfermant un groupement SH libre que la disparition d'eau oxygénée est totale et instantanée. En présence d'autres protéines dont la teneur en groupement SH libre est faible (édestine, albumine, globuline), elle est négligeable ou nulle.

Ceci nous a amenés à penser qu'entre autres, les groupements SH libres interviennent dans la décomposition du peroxyde. En effet, *Cl. sporogenes* est connu comme riche en groupement SH qu'on a mis en évidence qualitativement chez *Cl. saccharobutyricum* (réaction de Hopkins). Effectivement, en présence d'acide monoiodoacétique, inhibiteur des groupements SH, les suspensions bactériennes de *Cl. sporogenes* décomposent une quantité bien plus faible d'eau oxygénée (tableau VII), il se produit une inhibition de 90 p. 100 à pH 5.

L'autolysat de *Cl. saccharobutyricum*, obtenu en laissant des bactéries âgées de 48 heures, pendant six jours dans NaCl à 9 p. 1 000 à 37°, décompose l'eau oxygénée.

Pour mieux étudier ces substances responsables de la destruction du peroxyde, on a préparé des broyats de *Cl. sporogenes* : le liquide surnageant L (voir Techniques) décompose en anaérobiose environ 50 µg d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par milligramme d'azote. La suspension R (voir Techniques), en anaérobiose, décompose de 100 à 350 µg d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par milligramme d'azote. Elle est donc

TABLEAU VII. — Action de l'acide monoiodoacétique sur la décomposition de l'eau oxygénée par *Cl. sporogènes*.

1 cm<sup>3</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> correspondant à 400 µg, 5 cm<sup>3</sup> de suspension bactérienne correspondant à un poids sec de 3,85 mg, 0,2 cm<sup>3</sup> de CH<sub>2</sub>ICOOH M/1 000 concentrations finales (ou 0,2 cm<sup>3</sup> de H<sub>2</sub>O), complété à 10 cm<sup>3</sup> avec le tampon phosphate.

Agité une heure en anaérobiose à 37°.

Les bactéries sont mises en contact vingt minutes avec CH<sub>2</sub>ICOOH avant l'addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

	QUANTITÉS DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> DÉCOMPOSÉES en µg		POURCENTAGE d'inhibition
	sans inhibiteur	avec inhibiteur	
pH 4,9 . . . . .	120	12	90
pH 7,3 . . . . .	130	65	50

plus active que les bactéries intactes et que le liquide surnageant L. Aussi avons-nous étudié plus en détail l'action de la suspension R sur l'eau oxygénée. Si elle est préalablement soumise pendant quarante-cinq minutes à un courant d'oxygène, elle devient moins active (tableau VIII), en anaérobiose la décomposition d'eau oxygénée est diminuée de 30 p. 100. Au contraire, si, à la place d'oxygène, on fait passer un courant d'hydrogène dans cette même suspension, elle décompose ensuite (en anaérobiose) 30 p. 100 de plus que la suspension non traitée. Un passage d'hydrogène dans la suspension oxygénée ne restaure pas son activité initiale. La substance responsable de la décomposition du peroxyde doit être sous forme réduite.

TABLEAU VIII. — Influence du degré d'oxydation de la suspension R sur la décomposition de l'eau oxygénée.

2 cm<sup>3</sup> de suspension R correspondant à 1 mg d'azote, soumis pendant trois quarts d'heure, à 45°, à un passage d'oxygène ou d'hydrogène (la suspension témoin est conservée pendant ce temps en anaérobiose).

On ajoute 0,5 cm<sup>3</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> correspondant à 400 µg, complété à 3 cm<sup>3</sup> avec tampon phosphate 7,3 M/15, agité en anaérobiose une heure à 37°.

	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> DÉCOMPOSÉE exprimée en µg par milligramme de bactéries
Suspension R témoin . . . . .	267
Suspension R oxygénée . . . . .	197
Suspension R hydrogénée . . . . .	350

## DISCUSSION.

D'après l'ensemble de nos résultats, nous pouvons affirmer que les anaérobies stricts et les anaérobies facultatifs sont capables de décomposer l'eau oxygénée par des mécanismes différents des systèmes catalasiques ou peroxydasiques connus. De plus, chez les anaérobies facultatifs, même dépourvus de catalase, l'eau oxygénée formée doit probablement participer aux mécanismes oxydatifs de la cellule en tant qu'accepteur d'hydrogène. Cet hydrogène peut être l'hydrogène moléculaire activé par l'hydrogénase ou peut provenir d'un autre substrat par l'intermédiaire d'un système enzymatique (peroxydase ou système déshydrogénasique non sensible au cyanure ou azoture), ce qui explique la nécessité d'un substrat pour la décomposition d'eau oxygénée.

Chez les anaérobies stricts le mécanisme de la décomposition d'eau oxygénée est plus complexe. Il semble que, outre l'existence du mode de décomposition sus-indiqué chez les anaérobies facultatifs, par l'hydrogène actif, il y ait une substance responsable de la disparition du peroxyde, qui doit exister sous forme réduite. En effet, la suspension R hydrogénée est plus active que la suspension non traitée et encore plus active que la suspension oxygénée. C'est ainsi que l'hydrogène intervient, mais indirectement, dans la décomposition d'eau oxygénée en réduisant une ou des substances X. Cette substance X est insensible au cyanure, inhibée par l'acide monoiodoacétique, ce qui fait penser à une substance à groupement SH. On connaît d'ailleurs l'importance de ces groupements qui entrent dans la constitution de nombreux enzymes et leur rôle fondamental pour la défense des anaérobies contre l'oxygène.

En tout cas, l'eau oxygénée agit, chez les anaérobies stricts, sur une ou plusieurs substances responsables du dégagement d'hydrogène et en particulier sur les déshydrogénases. Il faut remarquer l'extrême sensibilité de ces enzymes à l'eau oxygénée : 2,5  $\mu$ g d'eau oxygénée par milligramme de bactéries (voir conditions expérimentales dans tableau V) suffisent pour inhiber fortement la plupart d'entre elles, alors que les bactéries peuvent en décomposer une quantité quatre fois plus forte. Ceci peut s'interpréter en supposant que l'eau oxygénée agit sur les déshydrogénases avant d'être décomposée par la substance X des bactéries ou bien que, responsable de la décomposition d'eau oxygénée, cette substance intervient dans le fonctionnement des déshydrogénases à l'état réduit. Son oxydation par l'eau oxygénée entraîne donc l'inhibition de ces enzymes.

Cette fragilité de la plupart des déshydrogénases et tout particulièrement de la formico-déshydrogénase expliquerait en

grande partie l'extrême sensibilité des anaérobies stricts à l'eau oxygénée.

Il reste pourtant à expliquer pourquoi les anaérobies facultatifs peuvent supporter une concentration beaucoup plus grande d'eau oxygénée que les anaérobies stricts. Il est probable que les déshydrogénases des anaérobies facultatifs sont protégées par un système tampon contre le peroxyde. En particulier, on sait, depuis Gale [19], que dans les préparations enzymatiques de *E. coli* privées du système cytochromique, la formico-déshydrogénase est très sensible à l'oxygène, alors que, si le système est présent, l'enzyme est protégé contre l'oxygène qui peut même jouer le rôle d'accepteur d'hydrogène.

Cependant, nous avons vu que les anaérobies stricts eux-mêmes peuvent lutter contre l'eau oxygénée dans certaines limites sans que ceci provoque une perturbation apparente dans le métabolisme.

Certes, les quantités d'eau oxygénée décomposée par les suspensions d'anaérobies dans les expériences décrites sont plus faibles que celles qui devraient se former théoriquement par rapport à l'oxygène absorbé lors de l'oxydation des différents substrats. Mais il faut se rappeler que les bactéries sont placées dans des conditions différentes suivant qu'elles ont à décomposer l'eau oxygénée naissante ou des quantités relativement fortes, extérieures à la cellule.

Keilin et Hartree [20] ont, par exemple, montré que la catalase ne peut oxyder l'éthanol par l'eau oxygénée suivant la réaction :



que lorsque l'eau oxygénée est sous forme naissante. Elle doit provenir d'une réaction biologique (comme l'action de l'oxydase sur l'hypoxanthine) ou de la décomposition du peroxyde de baryum ou cérium. En présence d'eau oxygénée libre, fournie de l'extérieur, la réaction ne se fait pas. Toutefois, Keilin et Hartree arrivent à oxyder l'alcool par l'eau oxygénée en présence de catalase, à condition d'ajouter l'eau oxygénée goutte à goutte, ou, mieux encore, par volatilisation d'eau oxygénée à 30°. Mais la réaction ne se fait que partiellement et le rendement est moins bon qu'avec l'eau oxygénée naissante.

Le simple fait qu'on ne peut mettre en évidence l'eau oxygénée chez les anaérobies ne permet donc pas d'affirmer qu'il ne s'en forme pas. Il est plus vraisemblable de penser que l'oxygène intervient chez les anaérobies stricts (et peut-être chez certains anaérobies facultatifs), comme simple accepteur d'hydrogène, en donnant l'eau oxygénée qui est décomposée par des mécanismes différents des systèmes catalasique ou peroxydasique connus.



Nous remercions M. le professeur E. Aubel pour ses suggestions et le grand intérêt qu'il a bien voulu porter à notre travail.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. GRUNBERG. *Ces Annales*, 1948, **74**, 216. — E. AUBEL, A. J. ROSENBERG et M. GRUNBERG. *C. R. Acad. Sci.*, 1945, **221**, 190 ; *Helv. Chim. Acta*, 1946, **29**, 1267.
- [2] K. F. YAMAFUGI, M. INAOKA et H. WADA. *Enzymologia*, 1950, **14**, 54.
- [3] O. WARBURG et W. CHRISTIAN. *Bioch. Zeitschr.*, 1933, **260**, 499.
- [4] A. BERTHO et H. GLUCK. *Liebigs Ann.*, 1932, **494**, 159.
- [5] E. AUBEL et J. HOUGET. *Rev. Can. Biol.*, 1945, **4**, 488. — E. AUBEL et E. PERDIGON. *Rev. Can. Biol.*, 1945, **4**, 498. — E. AUBEL, A. J. ROSENBERG et N. DE CHEZELLES. *Rev. Can. Biol.*, 1945, **4**, 502.
- [6] P. K. STUMPF et D. E. GREEN. *J. Biol. Chem.*, 1944, **153**, 387.
- [7] B. NISMAN et G. VINET. *Ces Annales*, 1950, **78**, 115.
- [8] H. C. DOUGLAS. *J. Bact.*, 1947, **54**, 272.
- [9] E. C. GREISEN et I. C. GUNSALUS. *J. Bact.*, 1943, **45**, 16.
- [10] H. W. SEELEY et P. J. VANDERMARK. *J. Bact.*, 1951, **61**, 29.
- [11] H. W. SEELEY et C. DEL RIO-ESTRADA. *J. Bact.*, 1951, **62**, 649.
- [12] E. AUBEL, M. GRUNBERG-MANAGO et J. SZULMAJSTER. *Bioch. Bioph. Acta*, 1949, **3**, 442.
- [13] R. C. BARD et I. C. GUNSALUS. *J. Bact.*, 1950, **59**, 387.
- [14] D. KEILIN et E. F. HARTREE. *Bioch. J.*, 1945, **39**, 148.
- [15] R. H. BROH-KHAN et L. A. MIRSKY. *J. Biol. Chem.*, 1931, **92**, 535.
- [16] M. GRUNBERG-MANAGO, J. SZULMAJSTER et A. PROUVOST. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1690.
- [17] E. AUBEL, A. J. ROSENBERG et J. SZULMAJSTER. *Experientia*, 1947, **8**, 107.
- [18] E. AUBEL, A. J. ROSENBERG et J. SZULMAJSTER. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 192.
- [19] E. F. GALE. *Bioch. J.*, 1939, **33**, 1012.
- [20] D. KEILIN et E. F. HARTREE. *Bioch. J.*, 1945, **39**, 293.

## DE LA RICHESSE D'UN SOL EN MICROORGANISMES NITRIFICATEURS

par O. COPPIER et H. DE BARJAC (\*).

*(Institut Pasteur. Service de Microbie technique.  
Laboratoire de Microbiologie du Sol.)*

L'évaluation quantitative de la potentialité nitrificatrice de la terre a été l'objet de nombreuses recherches, et les différents auteurs qui s'y sont intéressés ont exprimé leurs résultats de manières très différentes. Cette diversité de présentation correspond à deux ordres d'idée :

Dosage des nitrates apparus dans un milieu ammoniacal ensemencé par une quantité déterminée de terre. Ainsi ont opéré, aux variantes près, Rémy, Bulhert et Fickendey, Barthel, Perotti, Löhnis [1]; Meiklejohn [2]; Waksman [3]; Lees, Quastel et Scholefield [4].

Pourcentage de grains de terre fertiles sur un milieu électif, soit solide (Winogradsky) [5], soit liquide (Kauffmann et Boquel) [6].

Le dosage des produits de transformation nous renseigne sur l'activité nitrificatrice de la terre, mais non sur sa richesse en germes.

Et la détermination du pourcentage de grains fertiles nous paraît être une donnée peu précise.

En effet, sur plaque de silico-gel (méthode de Winogradsky) seuls les germes localisés à la portion de surface du grain au contact du milieu vont se développer ; surface éminemment variable avec le volume, la forme et la structure du grain. Une terre très humide, ou d'une texture lui permettant d'absorber une quantité importante d'eau à partir du silico-gel, se délitera : le grain s'étalera, et les germes contenus à l'intérieur vont alors, *et seulement*, se développer.

D'autre part, cette méthode comporte certains inconvénients, déjà en partie signalés par J. Kauffmann et G. Boquel dans une note récente [6].

Sur les plaques où la source d'N est un sel d' $\text{NH}_4$ , les grains

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 mars 1952.

s'entourant d'une auréole translucide de par la dissolution de l'émaillage calcaire révèlent la présence de ferments nitreux. Mais ces auréoles sont presque toujours de tailles très inégales, et leur diamètre varie facilement, entre les  $x$  grains positifs d'une même plaque, du simple au décuple. Nous avons obtenu, personnellement, des auréoles de 1,5 cm de diamètre autour de certains grains, alors que d'autres ne présentaient qu'un minuscule liséré translucide, ou même un simple « trou » de quelques dixièmes de millimètre sur le côté du grain de terre. Cela doit-il être attribué à un nombre plus ou moins grand de germes nitreux au départ dans le grain ? De plus, on assiste souvent à l'apparition de tels « trous » sur l'émaillage *en dehors* des grains. Comment les interpréter ?

La lecture est encore plus délicate sur plaque au nitrite ; les colonies de bactéries nitriques forment une petite tache jaunâtre, qu'il est presque impossible de différencier des taches colorées dues à la diffusion autour des grains des substances humiques de la terre. Et, si l'on admet que les auréoles caractérisant les colonies nitreuses sont causées par la dissolution de l'émaillage de carbonate par l'acide nitreux formé, comment penser que les colonies nitriques ne forment pas, elles aussi, une auréole par un processus équivalent ( $\text{NO}_3\text{H}$  formé) ? En fait, il y a quelquefois des « trous » sur plaques au nitrite, mais très rarement.

Il faudrait tester séparément chaque grain, ce qui est impossible par voie chimique ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$  formés diffusant rapidement à toute la plaque de silico-gel) et fort délicat par examen microscopique : ce dernier est souvent pauvre en germes, qui sont très difficiles à identifier morphologiquement.

La modification apportée récemment par J. Kauffmann et G. Boquel à cette technique (*loc. cit.*) ne lève pas toutes ces objections. Si ces auteurs pratiquent un test chimique individuel sur chaque grain, la recherche n'est pas poursuivie dans les deux cas par un procédé comparable : pour les nitreux, ils cherchent l'apparition du produit de transformation, pour les nitriques, la disparition totale de la source azotée fournie.

En outre, leur méthode donne encore, pour chaque grain de terre, une réponse « tout ou rien ». En dénombrant les grains fertiles, on ne préjuge aucunement de leur richesse en micro-organismes nitrificateurs : qu'ils contiennent une ou plusieurs colonies, importantes ou minuscules, la réponse sera uniformément positive, pourvu qu'un « seuil » de croissance soit atteint. La grosseur du grain de terre, qui dépend essentiellement de l'expérimentateur et de la structure physique de la terre, influencera d'une manière très importante les résultats. Le « seuil » de croissance sera la quantité  $s$  de germes nécessairement présents dans le milieu pour qu'une culture ait lieu (seuil qui peut être

égal à l'unité pour les germes capables de proliférer à partir d'une cellule unique). Pour une terre d'une richesse donnée en microorganismes nitrificateurs, plus le grain prélevé sera gros, plus la probabilité qu'il contienne la quantité  $s$  de germes sera grande.

Nous avons donc cherché à obtenir une *répartition plus égale* des germes fixés sur les particules de terre, par triburation au mortier et émulsion dans l'eau ; notre test sera basé sur la quantité minima de terre donnant encore lieu au phénomène de nitrification. Et les résultats seront exprimés par un simple chiffre, un « indice de nitrification ».

#### TECHNIQUE.

1° PRINCIPLE. — Ensemencer un milieu électif avec des dilutions de plus en plus grandes de terre homogénéisée, et rechercher la dilution maxima pour laquelle on a encore une culture (présence de  $\text{NO}_2$  pour les ferments nitreux, de  $\text{NO}_3$  pour les ferments nitriques).

2° RÉALISATION DES DILUTIONS. — Prise d'essai de 1 g (évalué en poids sec). Broyer au mortier stérile, à sec, puis avec 9 g d'eau de Seine (1) stérile. Réaliser ensuite des dilutions de 10 en 10 formant ainsi une gamme :

$$10^{-1} \quad 10^{-2} \quad 10^{-3} \quad 10^{-4} \quad \dots \quad 10^{-7} \quad (2)$$

(Chaque dilution contiendra respectivement :

$$0,10 \text{ g/cm}^3 \quad 0,01 \text{ g/cm}^3 \quad 1 \text{ mg/cm}^3 \quad 0,1 \text{ mg/cm}^3, \text{ etc...}, \text{ de terre}).$$

Il est important de mélanger soigneusement chaque dilution par quatre ou cinq pipettages avant de prélever les quantités nécessaires à réaliser soit la dilution suivante, soit les ensemencements, ceci pour obtenir la répartition la plus homogène possible.

3° MILIEUX DE CULTURE. — Plusieurs essais nous ont amenés à préférer l'emploi des milieux suivants, dont la concentration en azote est de 0,20 p. 1 000.

(1) Nous employons pour toutes les manipulations (émulsions, dilutions, préparations des milieux) l'eau de Seine stérilisée ; l'eau de conduite fournie à Paris contenant des antiseptiques susceptibles d'entraver les cultures, et l'eau distillée des traces non négligeables de cuivre.

(2) La gamme jusqu'à  $10^{-7}$  s'est avérée suffisante pour les différents échantillons de terre sur lesquels nous avons expérimenté, mais il peut être nécessaire de pousser les dilutions jusqu'à  $10^{-10}$  et même au delà, dans le cas de terres particulièrement riches, de boues activées, etc.

Pour les germes nitreux :

Milieu salin de Winogradsky, dilué au 1/20 . . . . .	1 000 cm <sup>3</sup>
CO <sub>3</sub> Ca . . . . .	1 g
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	0,50 g

Pour les germes nitriques :

Milieu salin de Winogradsky, dilué au 1/20 . . . . .	1 000 cm <sup>3</sup>
CO <sub>3</sub> Ca . . . . .	1 g
NO <sub>3</sub> Na . . . . .	0,99 g

Répartir en tubes à hémolyse : 1 cm<sup>3</sup> par tube. Boucher au coton. Stériliser vingt minutes à 112°.

4° ENSEMENCEMENT. — 0,50 g de dilution par tube, 4 tubes pour chacune des dilutions.

Séjour à l'étuve à 29° pendant un mois, avec agitation tous les quatre jours pour permettre une meilleure neutralisation du milieu par le CO<sub>3</sub>Ca qui se dépose au fond des tubes.

5° LECTURE. — Dans les tubes nitreux : recherche du dernier tube dans lequel on peut encore déceler la formation, à partir des ions NH<sub>4</sub> fournis, de nitrite (ou de nitrate, le stade nitrite étant transitoire) par le réactif à la diphénylamine sulfurique (coloration bleue).

Dans les tubes nitriques : recherche du dernier tube dans lequel on peut encore caractériser NO<sub>3</sub>. On utilisera le même réactif après avoir pris la précaution d'éliminer les nitrites qui peuvent n'avoir été que partiellement transformés dans le milieu (décomposition par l'urée ou l'azide de sodium en présence d'acide sulfurique).

6° RÉSULTATS. — Il nous a paru commode d'adopter, pour rendre compte des résultats, une échelle analogue à celle utilisée pour les pH.

Le degré d'acidité ou de basicité d'une solution est exprimé d'une manière simple et claire par le cologarithme de sa concentration en ions H<sup>+</sup> (=pH). Nous définirons ici un « indice de nitrification » qui sera le cologarithme de la dilution maxima positive. Lorsque (cas de LI, LF...) la zone limite est indécise, la dernière dilution comportant à la fois des tubes positifs, des tubes négatifs et des tubes dans lesquels on ne peut révéler que des traces de produit transformé, on donnera à l'indice de nitrification une valeur intermédiaire, compte tenu du pourcentage de tubes positifs dans la dilution envisagée.

Voici quelques-uns des résultats obtenus au laboratoire avec différents échantillons de terre :



TABLEAU I. — Germes nitreux.

	TG	TP	LI	LP	C <sub>3</sub>
10 <sup>-1</sup>	+	+	+	+	+
10 <sup>-2</sup>	+	+	+	+	-
10 <sup>-3</sup>	+	+	+	+	-
10 <sup>-4</sup>	+	+	-	+	-
10 <sup>-5</sup>	-	+	-	-	-
10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-	-
10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	-
Indice	4	5	2.75	4	0.50

TABLEAU II. — Germes nitriques.

	TG	TP	LI	LP	C <sub>3</sub>
10 <sup>-1</sup>	+	+	+	+	+
10 <sup>-2</sup>	+	+	+	+	-
10 <sup>-3</sup>	+	+	-	+	-
10 <sup>-4</sup>	+	+	-	+	-
10 <sup>-5</sup>	-	+	-	-	-
10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-	-
10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	-
Indice	4	5	1.5	3.5	0.75

Ces écarts sont toujours très faibles, ainsi que le montrent les chiffres ci-dessous :

TABLEAU III.

	Terre O - Nitreux	Nitriques
$10^{-1}$	+++++	+++++
$10^{-2}$	+++++	+++++
$10^{-3}$	+++++	+++++
$10^{-4}$	+++++ ε	+++++
$10^{-5}$	+++++ ε ε ε	+++++ ε ε ε
$10^{-6}$	-----	ε ε ε -----
$10^{-7}$	-----	-----
Indice:	5	5

TG, terre de prairie ombragée (juin 1951).

TP, terre référence : jardin de l'Institut Pasteur (septembre 1951).

LI, terre de Beauce [champs donnant des récoltes moyennes] (septembre 1951).

LF, terre de Beauce [champs donnant de très belles récoltes] (septembre 1951).

C<sub>3</sub>, tourbière de Cérisset [forêt de Rambouillet] (novembre 1951).

— La concordance de la méthode a été vérifiée, en ensemençant non plus 4 tubes, mais 10 tubes par dilution. Nous donnerons seulement les résultats de la terre O comme exemple (TP, novembre 1951).

Tous les tubes d'une même dilution se comportent de la même manière (aux erreurs d'expériences près), sauf pour la « zone de virage », dans laquelle l'ensemencement est de l'ordre de grandeur du seuil  $\pm \varepsilon$  (voir tableau III).

— Pour étudier la *fidélité* de notre méthode, nous avons cherché quel pourrait être l'écart entre les résultats obtenus à partir de prises d'essai différentes de 1 g : H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> ..., H<sub>10</sub> prélevées sur une même terre (TP, octobre 1951) [voir tableaux IV et V].

Nous ne pouvons faire actuellement aucune hypothèse sur la quantité réelle de germes représentée par le « seuil ». Notre technique n'a donc pas la prétention d'être rigoureuse, mais elle nous a semblé intéressante dans son principe et pratique dans ses résultats.

Nous espérons qu'elle nous permettra prochainement d'étudier

TABLEAU IV. — Germes nitreux.

	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub>	H <sub>4</sub>	H <sub>5</sub>	H <sub>6</sub>	H <sub>7</sub>	H <sub>8</sub>	H <sub>9</sub>	H <sub>10</sub>
10 <sup>-1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 <sup>-2</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 <sup>-3</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 <sup>-4</sup>	+	ε	ε	+	+	+	+	ε	ε	+
10 <sup>-5</sup>	+	ε	ε	+	ε	ε	+	+	+	+
10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indice:	4.75	5	4.75	4.5	5.00	4.90	4.75	5.1	4.90	5.00

TABLEAU V. — Germes nitriques.

	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub>	H <sub>4</sub>	H <sub>5</sub>	H <sub>6</sub>	H <sub>7</sub>	H <sub>8</sub>	H <sub>9</sub>	H <sub>10</sub>
10 <sup>-1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 <sup>-2</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 <sup>-3</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 <sup>-4</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 <sup>-5</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 <sup>-6</sup>	ε	ε	-	-	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indice:	5.25	5.50	5.1	5	5.3	5.75	5.5	5.5	5.5	4.75

d'une manière plus précise cette notion de seuil, et peut-être d'en déduire la quantité de germes réellement présents dans nos tubes de culture.

Nous nous sommes ici volontairement bornés à une étude du groupement physiologique pris dans son ensemble, sans chercher à isoler, à caractériser, ou à évaluer l'activité des espèces responsables de la nitrification ou de la nitratisation.

« Les principaux problèmes de la microbiologie du sol sont de nature œcologique. Les méthodes d'analyse valables doivent s'appuyer sur la microflore totale du sol considérée comme un collectif autoréglable. Le facteur de compétition naturel ne peut se remplacer par aucun artifice de technique. »

Ces lignes de Winogradsky nous paraissent justifier assez l'idée directrice de nos recherches, qui fut de donner un schéma pratique et différentiel de la nitrification selon les terres, tout en respectant, autant que faire se peut, les conditions œcologiques.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] O. VERONA. *Elementi di Microbiologia pedologica*. Macri, édit. Firenze, 1947.
- [2] J. MEIKLEJOHN. *Plant a. Soil*, 1951, **3**, 88.
- [3] S. A. WAKSMAN. *Principles of Soil Microbiology*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1927.
- [4] H. LEES. *J. Agricultural Science*, 1946, **37**, 27. — J. H. QUASTEL et P. G. SCHOLEFIELD. *Bact. Rev.*, 1951, **15**, 1-53.
- [5] S. WINOGRADSKY. *Microbiologie du Sol*. Masson, édit. Paris, 1949.
- [6] J. KAUFFMANN et G. BOQUEL. *Ces Annales*, 1951, **81**, 667.

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>.*)

Séance du 8 mai 1952.

Présidence de M. GASTINEL.

---

## PRÉSENTATION D'OUVRAGE

M. Lépine : J'ai l'honneur de présenter à la Société Française de Microbiologie, le *Dictionnaire Anglais-Français et Français-Anglais de termes médicaux et biologiques*, qui vient de paraître (1). Il est l'aboutissement de longs mois de travail et de l'habitude prise il y a plus de vingt ans, de relever les termes de la langue médicale et scientifique qui pouvaient prêter à confusion en passant d'une langue dans l'autre.

La réalisation du dictionnaire est elle-même le résultat des travaux effectués, depuis 1945, pour la rédaction de l'édition française du *British Medical Bulletin* à l'occasion de laquelle la nécessité d'un ouvrage spécialisé était apparue à tous les traducteurs. Les Editions Médicales Flammarion ont bien voulu accueillir l'œuvre dont la réalisation matérielle a été favorisée par la collaboration précieuse de M<sup>lle</sup> Krassnoff. La révision et la correction du manuscrit, puis des épreuves ont pris plus de deux ans au cours desquels se sont constamment ajoutés des mots nouveaux qui ont allongé le texte primitif. Prévu à l'origine pour 20 000 mots, le dictionnaire en héberge aujourd'hui plus de 65 000, parmi lesquels 12 000 termes anatomiques. Conçu primitivement pour les médecins, le vocabulaire a été progressivement étendu au domaine biologique, puis aux domaines physique et chimique dans la mesure surtout où ils intéressent les biologistes. Toutes les fois où cela a été possible, les expressions idiomatiques ont été signalées, les termes dont l'emploi est propre aux Etats-Unis ont été indiqués. Quinze pages donnent, à l'usage du lecteur, les correspondances des unités de poids et de mesures ainsi que les tables d'équivalence qui permettent instantanément la conversion des différentes données numériques pouvant se présenter aux traducteurs. Un soin particulier a été apporté à la nomenclature, pour laquelle les noms varient fréquemment d'une langue à l'autre.

(1) P. Lépine, *Dictionnaire Français-Anglais, Anglais-Français des Termes médicaux et biologiques*. Editions Médicales Flammarion, 22, rue de Vaugirard, Paris (VI<sup>e</sup>) [1952], prix : 2 800 fr.



Malgré d'inévitables erreurs ou oublis dont la correction aurait exigé encore plusieurs années de travail, nous espérons que cet ouvrage rendra service aux lecteurs, chaque jour plus nombreux, des travaux rédigés en langue anglaise ainsi qu'à ceux de nos collègues de langue anglaise qui ne se sont pas encore désintéressés de la littérature médicale et scientifique française.

## COMMUNICATIONS

### ACTIVITÉ ANTITUBERCULEUSE DE L'ISONICOTINHYDRAZIDE (INH)

par C. LEVADITI, A. VAISMAN et H. CHAIGNEAU-ERHARD

(*Institut Alfred-Fournier.*)

La découverte des propriétés antituberculeuses de l'isonicotinhydrazide (INH) semble avoir été effectuée, indépendamment et simultanément, par trois groupes de chercheurs appartenant à des centres d'études différents, à savoir : Aeschlimann, Fox, Grunberg et Schnitzer [1], Bernstein, Lotte, Steinberg et Yale [2] et Offe, Siefken et Domagk [3]. Cette découverte découle, jusqu'à un certain point, de celle de Chorine [4], confirmée par Mc Kenzie, Malone, Kushner, Oleson et Subbarow [5], Fust et Studer [6], Tanner [7], C. Levaditi et Vaisman [8], concernant les effets antibacillaires de l'amide de l'acide nicotinique. Fust [9], de même que Uehlinger, Siebermann et Frei [10], ont résumé récemment l'ensemble des connaissances actuelles sur l'INH, en particulier celles se rapportant à ses effets curatifs dans la tuberculose expérimentale de la souris et du cobaye.

Il nous a semblé particulièrement intéressant d'étudier le même problème du point de vue expérimental, sans présumer de l'opportunité de l'interpolation de nos conclusions dans le cadre de la thérapeutique de la tuberculose humaine. C'est à cette étude que se réfère la présente note.

I. TOLÉRANCE. — L'INH utilisée dans nos investigations a été préparée par MM. Girard et Ray. Administrée *per os*, à la dose unique de 2 à 3 mg par 20 g, elle est parfaitement tolérée par la souris, de même qu'à raison de 1 mg répété quotidiennement.

II. ACTIVITÉ BACTÉRIOSTATIQUE « IN VITRO » (souche de BK H37Rv). — Effet radical à la dose de 5 à 10 mg p. litre (milieu de Dubos).

III. EFFETS THÉRAPEUTIQUES CHEZ LA SOURIS. — *Technique.* — Souris contaminées par injection intraveineuse de 2 mg de BK souche H37Rv (culture sur milieu de Löwenstein âgée de 18 jours). Nous avons choisi

cette dose élevée de bacilles, de manière à évaluer avec le maximum de sûreté l'activité de l'INH. Deux lots : le *premier* sert de *témoin non traité*, le *second* est *traité*. D'abord, pendant cinq jours, deux ingestions quotidiennes de 0,5 mg, puis, également quotidiennement, une première dose de 0,5 mg et une seconde de 1 mg (en tout : 46,5 mg). Les souris survivantes sont sacrifiées le trente-huitième jour. Enregistrement des décès et du taux de survies, et examen histologique des organes (poumon, foie, rate et rein) du point de vue lésionnel et microbiologique (hématéine et méthode de Ziehl-Neelsen).

RÉSULTATS. — A. SOURIS TÉMOINS (non traitées) :

1° *Mortalité* (entre vingt-deux et trente et un jours ; maximum entre vingt-deux et vingt-huit jours) : 100 p. 100. *Survie* : 0 p. 100.

2° *Lésions microscopiques* :

a) <i>Poumon</i> .	{	Entre +++ et $\infty$ . . . . .	100 p. 100
	{	$\infty$ . . . . .	80 p. 100
b) <i>Foie</i> . .		Entre + — et +++ . . . . .	95 p. 100
c) <i>Rate</i> . .	{	Entre + — et + . . . . .	60 p. 100
	{	0 . . . . .	40 p. 100
d) <i>Rein</i> . .	{	0 . . . . .	85 p. 100
	{	Entre + — — et + . . . . .	45 p. 100

*Résumé* : Tuberculose généralisée térébrante et constamment mortelle ; lésions intenses du poumon et peu marquées du foie et de la rate. Altérations rénales consistant en embolies de BK à siège glomérulaire et, plus rarement, en abcès bacillifères localisés au niveau de la région papillaire.

3° *Taux bacillaire* :

a) <i>Poumon</i> .	{	Entre ++++ et $\infty$ . . . . .	100 p. 100
	{	$\infty$ . . . . .	85 p. 100
b) <i>Foie</i> . .	{	Entre 0 et + — . . . . .	55 p. 100
	{	Entre + et ++ . . . . .	45 p. 100
c) <i>Rate</i> . .	{	Entre 0 et + — — . . . . .	75 p. 100
	{	Entre + et ++ . . . . .	25 p. 100
d) <i>Rein</i> . .	{	0 . . . . .	55 p. 100
	{	Entre + et ++++ . . . . .	45 p. 100

*Résumé* : Bacilliose très accusée du poumon ; lésions bacillifères assez pauvres en BK du foie et de la rate ; présence de bacilles acido-résistants dans le rein.

B. SOURIS TRAITÉES :

1° *Mortalité* (entre vingt-trois et trente-sept jours) : 25 p. 100. *Survie* le trente-huitième jour : 75 p. 100. Les décès des souris traitées (25 p. 100) ne sont pas dus à une infection tuberculeuse, mais à une contamination par un virus dont la nature reste à préciser.

## 2° Lésions microscopiques :

a) Poumon .	Entre 0 et + — . . . . .	100 p. 100
b) Foie . . .	{ Entre 0 et + — . . . . .	80 p. 100
	{ 0 . . . . .	35 p. 100
c) Rate . . .	{ Entre 0 et + — . . . . .	100 p. 100
	{ 0 . . . . .	95 p. 100
d) Rein . . .	0 . . . . .	100 p. 100

Résumé : Altérations de très faible intensité dans tous les organes. Intégrité du poumon oscillant entre 4/5 et 5/5 (1) dans la grande majorité des cas.

## 3° Taux bacillaire :

a) Poumon .	{ 0 . . . . .	25 p. 100
	{ Entre 0 et + . . . . .	75 p. 100
b) Foie . . .	{ 0 . . . . .	65 p. 100
	{ Entre + — — et + . . . . .	35 p. 100
c) Rate . . .	{ 0 . . . . .	45 p. 100
	{ Entre 0 et + — — . . . . .	85 p. 100
d) Rein . . .	0 . . . . .	100 p. 100

Résumé : L'ensemble de ces résultats montre que du point de vue aussi bien bacillaire que lésionnel, le poumon, ainsi que le foie et la rate n'offrent que des altérations légères, caractérisées par une bacillose des plus faible. Dans une proportion de 25 p. 100 des cas, le tissu pulmonaire se révèle totalement exempt de BK décelables microscopiquement et, souvent, chez d'autres sujets, on n'en constate qu'un ou deux dans l'ensemble de la préparation. En général, l'activité fonctionnelle du tissu pulmonaire est respectée. Rein non bacillifère.

CONCLUSIONS. — L'isonicotinhydrazide possède des propriétés antibacillaires de tout premier ordre. Ses effets se traduisent par la survie prolongée des souris traitées, par la légèreté des altérations observées (souvent même totalement absentes) et par la paucibacillose, voire même la stérilité bacillaire microscopique intégrale du poumon, du foie, de la rate et du rein. Son mécanisme d'action semble dissemblable de celui de la streptomycine. Des problèmes, tels ceux du dosage des effets antituberculeux, de la création de mutants de BK résistants, de l'activité comparée de l'INH et de la streptomycine ou du 469, sont en cours d'étude (2).

(1) Le chiffre placé à gauche du trait représente la surface pulmonaire restée indemne, par rapport à l'ensemble de cette surface, représenté par le chiffre 5.

(2) Dans une note, encore sous presse, présentée à la Société de Biologie (séance du 2 mars 1952), Rist et Grumbach étudient le même problème. Leurs résultats sont apparemment conformes aux nôtres, si l'on en juge d'après l'analyse du travail en question parue dans *La Presse Médicale*. Notre seconde note a été présentée à la séance du 26 mai 1952 de l'Académie des Sciences (sous presse).

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRUNBERG et SCHNITZER. *Quart. Bull. Sea View Hosp.*, 1952, **13** (Hoffmann-La Roche, Nutley).
- [2] BERNSTEIN, LOTTE, STEINBERG et YALE (Squibb and Sons).
- [3] OFFE, SIEFKEN et DOMAGK. *Naturwissenschaft.*, 1952, **39**, 118. — DOMAGK. *Gesell. Dtsch. Chem.*, Cologne, 25 janvier 1952 ; *Aerzt. Prax.*, 1952, **4**, n° 5 (Bayer-Leverkusen ; Wupperthal-Elberfeld).
- [4] CHORINE. *C. R. Acad. Sci.*, 1945, **220**, 150.
- [5] Mc KENZIE et coll. *J. Lab. Clin. Med.*, 1948, **33**, 1249.
- [6] FUST et STUDER. *Schweiz. Zeitschr. allg. Path. Bakt.*, 1951, **14**, 523.
- [7] TANNER. *Helv. Med. Acta*, 1951, **18**, 456.
- [8] C. LEVADITI et VAISMAN. *Ces Annales*, 1952 (sous presse).
- [9] FUST. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 1952, **82**, 333.
- [10] UEHLINGER, SIEBERMANN et FREI. *Ibid.*, p. 335.

## ACTION *IN VITRO* DE L'HYDRAZIDE DE L'ACIDE ISONICOTINIQUE SEUL ET COMBINÉ AVEC D'AUTRES PRODUITS

par M<sup>me</sup> AITOFF.

(Laboratoires Debat, Garches.)

L'hydrazide de l'acide isonicotinique, dont l'action tuberculicide extraordinaire nous a été malheureusement révélée d'une manière assez tapageuse par la grande presse avant tout autre renseignement scientifique, a naturellement suscité l'intérêt de tout le monde médical, aussi bien dans les cliniques que dans les laboratoires.

Il se présente sous l'aspect d'une poudre blanche, cristalline, très soluble dans l'eau à froid. La solution incolore et limpide donne un  $pH = 6,8$  à 1 p. 100 ; elle ne précipite pas avec les bouillons de culture. Toutes ces propriétés présentent des conditions parfaites pour l'expérimentation *in vitro*.

Les premiers résultats ont montré que « l'éventail » d'action de l'hydrazide isonicotinique est très restreint : le staphylocoque doré pousse normalement, comme le témoin, dans une solution à 0,2 p. 100 ; *Escherichia coli* est un peu plus sensible et est tué à cette dilution, mais donne une culture malingre avec formes atypiques géantes dans une solution à 0,1 p. 100. Il faut une concentration cinq fois plus grande pour arrêter le développement de *Aspergillus niger* et du *Penicillium notatum*.

Par contre, l'action *in vitro* sur le bacille tuberculeux, souche humaine virulente H37RV, est véritablement surprenante.

Je me suis servi du milieu de Dubos liquide, additionné d'une petite quantité (1/5000) de Tween 80, dans lequel le bacille de Koch donne une culture absolument homogène, dont l'opacité est très facile à

apprécier. La difficulté dans la préparation de ce milieu est la fraction V du sérum. Ici, je dois me louer de l'aide précieuse de M<sup>lle</sup> Salas, grâce à laquelle nous sommes arrivées à la préparer nous-mêmes au laboratoire, au lieu de la faire venir des Etats-Unis. Le précipité colloïdal est coagulé par un excès de chloroforme qui lui-même s'évapore pendant les quelques jours où les tubes non capuchonnés sont laissés à l'étuve.

Un autre ennui a été la quantité relativement considérable de tubes contaminés. En effet, la répartition à 4 cm<sup>3</sup> de milieu par tube, après filtration, malgré toutes les précautions prises, donne lieu à des contaminations fréquentes. J'ai pris le parti de tyndalliser le milieu après la filtration, ce qui nous a mis à l'abri de ces contaminations accidentelles. Les ensemencements faits parallèlement en milieu tyndallisé et non tyndallisé ont montré des cultures absolument identiques. La tyndallisation a de plus l'avantage de faire disparaître toute trace de chloroforme.

Dans une première expérience, j'ai poussé les dilutions jusqu'à 10<sup>-6</sup>, mettant l'hydrazide isonicotinique à égalité avec la streptomycine. Au bout de cinq jours, seuls les témoins avaient poussé, tous les autres tubes étaient restés clairs comme de l'eau de roche. Encouragée par ce premier résultat, je refis aussitôt, le 10 mars, une seconde expérience, en poussant les dilutions du produit jusqu'à 10<sup>-8</sup>, soit 1/100 000 000 (tableau I).

TABLEAU I. — Action de l'INH sur le BK.

		7 JOURS 17 mars	10 JOURS 20 mars	14 JOURS 24 mars	17 JOURS 27 mars	21 JOURS 31 mars	25 JOURS 4 avril
1. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 4 µg INH .	1 goutte de culture de 14 jours en Dubos.	—	—	—	—	—	++
2. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 2 µg INH .		—	—	—	—	—	+++
3. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 1 µg INH .		—	—	—	—	—	+++
4. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0,5 µg INH.		—	—	—	—	+	++++
5. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0,4 µg INH.		—	—	—	—	+	++++
6. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0,2 µg INH.		—	—	—	±	+++	++++
7. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0,1 µg INH.		—	—	—	+	++++	++++
8. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0,05 µg INH.		—	—	—	+	++++	++++
9. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0,04 µg INH.		—	—	++	++++	++++	++++
10. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0,02 µg INH.		—	±	+++	++++	++++	++++
11. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0,01 µg INH.		±	++	++++	++++	++++	++++
12. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0 µg INH .		++	++++	++++	++++	++++	++++
13. 4 émi <sup>3</sup> Dubos à 0 µg INH .		++	++++	++++	++++	++++	++++
14. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0 µg INH .		++	++++	++++	++++	++++	++++

—, pas de culture; ±, culture à peine perceptible; +, culture très faible; ++, culture faible; +++, culture nette; +++++, culture abondante.

En examinant ce tableau on voit que le pouvoir inhibitif de l'hydrazide isonicotinique est beaucoup plus considérable que son pouvoir bactéricide. En effet, au bout de sept jours, le tube 10, contenant la dose infime de 1/50 000 000, est clair; trois jours plus tard, une culture à peine perceptible était apparue dans ce tube et c'est le tube précédent, le tube 9, contenant 1/25 000 000 de produit, qui était limpide. Quatorze jours après le début de l'expérience, le tube 9 pré-



sentait une culture appréciable et l'inhibition s'arrêtait au tube 8 (1/20 000 000). Dans les jours qui suivirent la culture apparaissait de plus en plus nette dans les tubes successifs pour s'arrêter au bout de trois semaines au tube 3, dilution  $10^{-6}$  ou 1  $\mu$ g au centimètre cube ; vingt-cinq jours après, les 3 derniers tubes clairs avaient aussi légèrement poussé, ramenant ainsi l'activité de l'hydrazide à moins de 4  $\mu$ g au centimètre cube.

Si j'avais arrêté mon expérience après sept jours d'étuve, alors que les témoins avaient nettement poussé, j'aurais constaté un pouvoir bactériostatique très considérable, se chiffrant par la dose infime de 0,02. Or, ce chiffre correspond seulement au pouvoir inhibitif du nouveau produit, et non à son pouvoir bactéricide.

Aussi ai-je prolongé la durée de mes expériences suivantes jusqu'à un mois, alors que le contenu des différents tubes ne variait plus.

L'étude de la synergie de différentes substances tuberculicides pour augmenter leur action respective sur le bacille de Koch m'a amenée à faire depuis plus de deux ans toute une série d'expériences, en mélangeant d'une part la streptomycine aux différentes thiosemicarbazones de synthèse, d'autre part l'acide para-aminosalicylique (PAS) avec différentes quinones, et en particulier avec la vitamine K.

Les résultats obtenus ont montré pour certains produits une synergie très nette que je communiquerai ultérieurement. J'eus tout naturellement l'idée d'associer l'hydrazide isonicotinique au PAS.

Dans ces sortes d'expériences on peut procéder de deux façons différentes.

1° On peut associer une dose fixe insuffisante de l'un des produits à une dose variable, également au-dessous de la dose inhibitive de l'autre, en déterminant la dilution limite dans laquelle il y a arrêt complet de développement microbien ou inhibition nette de la culture comparativement à celle obtenue dans chacune des deux substances prises séparément.

2° Ou bien on peut mélanger dans des proportions variables les deux produits et s'en servir comme d'une solution mère qu'on dilue en comparant les résultats obtenus avec ceux qu'on obtient pour chacune d'entre elles, prise séparément.

Il faut évidemment pour chaque expérience faire la série de dilutions de chacun des produits, pris isolément, et ensemercer tous les tubes avec la même souche et la même pipette.

Je me suis servi de la seconde méthode en associant l'INH au PAS dans les proportions de : 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 et 1/300.

*Ces expériences ont toutes, sans exception, démontré une synergie très nette et très importante de ces deux substances.*

Contrairement à ce qu'on pouvait supposer, ce n'est pas la proportion dans laquelle la quantité de l'hydrazide était la plus élevée, 1/25, qui a donné les meilleurs résultats.

En association avec le PAS on obtient les chiffres suivants (voir tableau II) :

La meilleure combinaison des deux substances serait donc 1 d'hydrazide isonicotinique pour 100 de PAS (voir tableau III).

Si l'on examine attentivement ce tableau en le comparant au tableau I, on voit qu'à partir du dixième jour la stabilisation est

TABLEAU II.

PROPORTION DES MÉLANGES	INHIBITIONS STABLES APRÈS 1 MOIS D'ÉTUVE	
1 : 25 . . . . .	0,4 µg d'hydrazide.	10 µg PAS.
1 : 50 . . . . .	0,1 µg d'hydrazide.	5 µg PAS.
1 : 100 . . . . .	0,005 µg d'hydrazide.	0,5 µg PAS.
1 : 200 . . . . .	0,05 µg d'hydrazide.	10 µg PAS.
1 : 300 . . . . .	0,02 µg d'hydrazide.	6 µg PAS.

atteinte et ne change plus jusqu'au trentième jour, lorsque l'expérience peut être considérée comme terminée.

De plus le repiquage du tube 5, dernier tube clair, reste stérile, ce qui tendrait à prouver que l'on a affaire à une véritable action *bacté-*

TABLEAU III. — Effet synergique de l'INH avec le PAS sur le BK (proportion 1 : 100).

	7 JOURS 24 mars	10 JOURS 27 mars	14 JOURS 31 mars	18 JOURS 4 avril	21 JOURS 7 avril	23 JOURS 9 avril	29 JOURS 15 avril	30 JOURS 16 avril
I goutte de culture de 40 jours en Dubos.								
1. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0,05 µg INH et 5 µg PAS. . .	—	—	—	—	—	—	—	—
2. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0,025 µg INH et 2,5 µg PAS. . .	—	—	—	—	—	—	—	—
3. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0,02 µg INH et 2 µg PAS. . .	—	—	—	—	—	—	—	—
4. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0,01 µg INH et 1 µg PAS. . .	—	—	—	—	—	—	—	—
5. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0,005 µg INH et 0,5 µg PAS. . .	—	—	—	—	—	—	—	—
6. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0,0025 µg INH et 0,25 µg PAS. . .	—	±	±	+	+	+++	+++	++++
7. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0,002 µg INH et 0,2 µg PAS. . .	±	+	+	++	++	++++	++++	++++
8. 4 cm <sup>3</sup> Dubos à 0,001 µg INH et 0,1 µg PAS. . .	+	++	++	++++	++++	++++	++++	++++
9. 4 cm <sup>3</sup> Dubos . . .	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
10. 4 cm <sup>3</sup> Dubos . . .	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
11. 4 cm <sup>3</sup> Dubos . . .	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

*ricide*. La dilution de PAS dans ce tube est de 1/2 000 000, quantité dix à vingt fois inférieure à la dose bactéricide de ce produit seul *in vitro*.

La dilution de l'hydrazide isonicotinique est de 1/200 000 000, dose dix et vingt fois inférieure à la dose bactériostatique et plus de cent fois inférieure à la dose bactéricide.

**RÉSUMÉ.** — L'hydrazide isonicotinique agit *in vitro* d'une manière très énergique sur le bacille tuberculeux, jusqu'au bout de dix jours la culture est inhibée à  $10^{-8}$ . Pourtant cette action doit être considérée comme *bactériostatique* seulement puisque, dans les jours qui suivent, la culture se développe à des dilutions moindres et au bout d'un mois le microbe cultive à des taux inférieurs à  $10^{-6}$ .

L'association avec le PAS produit un effet synergique très net, surtout dans les proportions de 1 partie d'hydrazide isonicotinique pour 100 parties de PAS.

1 : 2 000 000 de PAS associé à 1 : 200 000 000 d'hydrazide isonicotinique produit un effet *bactéricide*.

## DISSOCIATION DES POUVOIRS BACTÉRIOSTATIQUE ET BACTÉRICIDE DE L'HYDRAZIDE ISONICOTINIQUE *IN VITRO*

par FERNAND TISON.

(Sanatorium de Praz-Coutant.)

En étudiant l'action de la streptomycine sur le bacille de Koch *in vitro* par la culture [1] et par le noircissement du tellurite de potassium [2], nous avons montré que les doses bactériostatiques, même multipliées par 1 000, n'étaient pas bactéricides.

Par une expérience calquée sur les précédentes, nous avons étudié l'action de l'hydrazine de l'acide isonicotinique (H.I.N.). Nous avons constaté récemment [3] que les doses bactériostatiques étaient plus de dix fois plus faibles que pour la streptomycine. Alors que Fust [4] espère une action bactéricide *in vitro* chez l'animal, parce que les souris n'ont pas rechuté après une cessation de traitement de vingt et un jours, Steeken et Wollinsky [5] ont montré que la rechute peut survenir dix semaines plus tard.

Nous avons réalisé des dilutions de H.I.N. de 9 concentrations différentes. La plus faible (0,1 microgramme par centimètre cube) était la dose bactériostatique [3]. La plus forte (1 000 microgrammes par centimètre cube) était dix mille fois la dose bactériostatique.

Des émulsions de bacilles tuberculeux vivants ont été portées dans 10 cm<sup>3</sup> de ces solutions et agitées fréquemment. Des prélèvements ont été faits après vingt-quatre heures, quarante-huit heures et une semaine de contact.

Ces prélèvements ont été lavés par centrifugation.

Une partie était mise en culture sur deux tubes de Löwenstein-Jensen.

L'autre partie était inoculée au cobaye. Ce qui représente 27 cultures et 27 inoculations.

RÉSULTATS. — 1° *Végétabilité*. — Après vingt-quatre heures de contact, toutes les cultures ont poussé en dix jours.

Après quarante-huit heures, les concentrations supérieures à 50 microgrammes avaient arrêté la végétabilité.

Après une semaine, aucune culture n'a poussé.

	CONCENTRATION (microgrammes par centimètre cube)								
	0,1	0,2	0,5	1	5	50	100	500	1 000
24 heures de contact .	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48 heures de contact .	+	+	+	+	+	+	0	0	0
Une semaine de contact.	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Culture  
sur milieu  
de Jensen.

2° *Virulence*. — Même après une semaine de contact avec la solution à 1 mg par centimètre cube, les bacilles avaient conservé leur virulence vis-à-vis du cobaye. Les animaux ont alors été aussi rapidement tuberculisés que les animaux témoins.

3° *Morphologie*. — Des colorations de Fontès ont été pratiquées sur chaque échantillon. La morphologie n'était pas altérée. Peut-être aurait-il fallu, comme Ruziczka [6], le microscope électronique pour constater des altérations.

CONCLUSION. — Question de concentration mise à part, l'action de l'H.I.N. *in vitro* se montre à ce point de vue assez comparable à celle de la streptomycine. La dose bactériostatique peut après une semaine altérer la végétabilité du bacille de Koch.

Une dose 10 000 fois supérieure à la concentration bactériostatique peut être tolérée vingt-quatre heures sans altérer la végétabilité.

La même dose peut être tolérée sept jours sans altérer la virulence pour le cobaye.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. TISON. *Ces Annales*, 1950, **79**, 100.
- [2] F. TISON. *Ces Annales*, 1949, **76**, 377.
- [3] F. TISON. *Ces Annales*, 1952, **82**, 760.
- [4] FUST. *Schw. med. Woch.*, 1952, **82**, 333.
- [5] STEENKEN et WOLINSKY. *Lancet*, 1952, **262**, 702.
- [6] RUZICZKA. *Ces Annales*, 1952, **82**, 334.

## INFLUENCE DES ENZYMES PROTÉOLYTIQUES SUR L'AGGLUTINABILITÉ DES GLOBULES ROUGES PAR LES VIRUS

par A. EYQUEM, C. HANNOUN et G. CATEIGNE.

(Institut Pasteur.

Service de M. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.)

On sait que les globules rouges qui ont été soumis à l'action de certains enzymes présentent des propriétés intéressantes pour le sérologiste. Ainsi, les globules rouges traités par l'enzyme R.D.E., sécrété par *Vibrio cholerae* ou *Welchia perfringens*, permettent de révéler l'existence d'une agglutinine « t » responsable du phénomène de pan-agglutination de Thomsen et Friedenreich (atteignant un titre élevé chez certains malades atteints de pneumonie atypique à virus).

Les globules rouges traités par un enzyme protéolytique permettent de révéler l'existence de certains anticorps actifs sous forme incomplète. Ainsi, les iso-agglutinines incomplètes de type anti-Rh qui se fixent sur les globules rouges Rh positifs normaux sans les agglutiner, lorsqu'ils sont en suspension dans de l'eau physiologique, peuvent provoquer l'agglutination si ces globules rouges ont été traités, au préalable, par un enzyme protéolytique. Cependant, tous les iso-immun-anticorps actifs sous forme incomplète ne sont pas révélables à l'aide de cette méthode. Ainsi, les agglutinines anti-Duffy (Fy<sup>a</sup>), mettant en évidence l'antigène du groupe sanguin humain Duffy (Fy<sup>a</sup>), ne sont pas révélables sous forme incomplète à l'aide de cette technique. Les globules rouges Duffy positifs traités par l'enzyme protéolytique n'absorbent pas l'agglutinine anti-Fy<sup>a</sup> incomplète. On sait, depuis les travaux de Hirst et de Burnet, que les virus du groupe grippe-maladie de Newcastle-oreillons se fixent sur les globules rouges sur un récepteur particulier qui présente certaines corrélations avec l'antigène T responsable du phénomène de Thomsen.

Cependant, certaines souches de virus de ce groupe présentent certaines anomalies sérologiques (souche C Taylor).

Il pouvait être intéressant de tenter d'établir une corrélation possible entre les récepteurs sur lesquels se fixent les virus et les antigènes de groupes sanguins.

Ainsi, nous avons examiné l'agglutinabilité des globules rouges normaux et traités par un enzyme protéolytique, par des suspensions de virus provenant de 8 souches : grippe A (PR8), grippe A' (D48 et Paris 1951), B (Lee et QUI), N. DV, oreillons (Paris 3/1950) et grippe porcine.

Nous avons constaté que, pour les souches de virus grippaux PR8, D48, QUI, B Lee, le virus de Newcastle, le virus des oreillons



Paris 3/1950 et une souche de grippe porcine, il n'y avait pas de différence notable dans l'agglutinabilité des globules rouges humains normaux ou traités.

Mais une souche de virus de grippe du groupe A' (Paris 1951), présentant un titre agglutinant de 1/2560 vis-à-vis des globules rouges normaux, se révélait incapable d'agglutiner les globules rouges, provenant du même individu, traités par un enzyme protéolytique.

Les globules rouges utilisés au cours de cette première expérience provenaient d'un donneur possédant les antigènes de groupes sanguins O, MN, Rh positif (CDce), K ou k, Fya. Ces globules rouges avaient été traités par de la papaïne purifiée pendant une heure à 37°.

Au cours d'une deuxième expérience, nous avons constaté que la modification du comportement des globules rouges était progressive et que l'agglutinabilité des globules rouges normaux, qui était de 1/256, passait à 1/32 après quinze minutes d'action de l'enzyme et 1/8 après soixante minutes, lorsque ces globules rouges étaient mis en contact avec une suspension de virus grippal Paris 1951. Des globules rouges, traités dans les mêmes conditions, présentaient une légère augmentation de leur agglutinabilité par le virus PR8.

L'examen du comportement des globules rouges de différents donneurs de sang possédant des mosaïques d'antigènes différentes nous a montré que tous les individus du groupe O, par exemple, ne présentaient pas le même comportement vis-à-vis du virus A' Paris 1951. Chez certains de ces sujets, les globules rouges traités par un enzyme protéolytique présentaient une agglutinabilité égale à celle des globules rouges normaux. Chez d'autres, au contraire, on retrouvait le phénomène que nous avons signalé.

Jusqu'à maintenant, il n'a pas été possible d'établir de corrélation entre ce phénomène et les antigènes de groupes sanguins suivants : A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, AB, O, M et N, P, Rh (CDE, cde), Kell, Lutheran.

Cependant, il n'est pas encore possible d'exclure l'existence d'une corrélation entre la présence de l'antigène Duffy Fya et ce phénomène.

Connaissant le comportement particulier des globules rouges provenant de sujets atteints de maladie de Marchiafava-Micheli ou hémoglobinurie paroxystique, nous avons étudié l'agglutinabilité de ces globules rouges normaux et traités par les souches de virus dont nous disposons. On sait, en effet, que les globules rouges de ces malades permettent de mettre en évidence des agglutinines ou des hémolysines qu'il n'est pas possible de révéler autrement.

Ces globules rouges, obtenus grâce à l'amabilité de M. Bousser, provenaient de malade O Rh positif et nous ont permis de mettre en évidence le phénomène de disparition d'agglutinabilité à l'aide de la souche A' Paris 1951. Ces globules rouges présentaient avec les autres virus le même titre lorsqu'ils étaient traités ou utilisés sans traitement par enzyme protéolytique. Cependant, l'agglutinabilité est légèrement supérieure lorsque les globules rouges traités sont utilisés pour le titrage de suspension de virus ourlien.

Il est nécessaire d'étudier les corrélations existant entre ce phénomène et la présence de l'antigène de groupe sanguin Duffy sur un beaucoup plus grand nombre de donneurs et, d'autre part, d'étudier

le comportement des globules rouges d'animaux possédant certains antigènes de groupes sanguins ; ceci nous permettra une connaissance plus intime des corrélations existant entre les récepteurs globulaires sensibles au virus et les antigènes érythrocytaires.

## UN DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL D'EXCEPTION *MALLEOMYCES PSEUDO-MALLEI* ET *BACILLUS LATEROSPORUS*

par E. R. BRYGOO,

(Institut Pasteur de Saïgon.)

Dans les pays du Sud-Est asiatique, où la mélioidose est endémique, lorsqu'apparaît dans un ballon d'hémoculture un bacille mobile, Gram-négatif, donnant un voile à la surface du milieu, l'on doit penser à un bacille de Whitmore, et lorsque le portoir d'identification aura montré des caractères cultureux et biochimiques comparables à ceux de *Malleomyces pseudo-mallei*, les présomptions en faveur de ce germe seront si grandes que l'on sera souvent tenté de donner immédiatement au clinicien une réponse formelle. Cependant il serait imprudent de le faire avant un essai de virulence sur l'animal. Déjà, en 1948, Capponi [1], dans une note sur le diagnostic bactériologique de la mélioidose, insistait sur le fait que seule l'inoculation au cobaye permet de l'affirmer. Le cas suivant en est un exemple.

Au cinquième jour d'une hémoculture, un voile apparaît sur le milieu ; il se révèle, à l'examen direct, comme formé de bacilles mobiles, Gram-négatifs. L'isolement sur gélose donne des colonies blanches, sèches, se plissant rapidement ; en quarante-huit heures, elles prennent un reflet métallique à la partie inférieure des tubes de gélose. Sur tous les milieux liquides il se forme, en deux jours, un voile net qui se plisse et remonte de 1 à 2 mm le long des parois ; glucose, maltose et mannite sont lentement acidifiés, le rouge neutre est réduit, la partie supérieure du lait est peptonisée, le sérum coagulé digéré. Ce portoir est si caractéristique du bacille de Whitmore que plusieurs techniciens de notre entourage, connaissant bien ce germe, s'y trompent. Les seuls éléments légèrement discordants sont l'absence d'odeur des cultures et l'aspect des colonies sur gélose qui, malgré leurs rides, sont très plates ; mais devant l'abondance des caractères positifs, ces deux signes ne suffisent pas à infirmer l'identification ni même à faire envisager un diagnostic différentiel.

Comme d'habitude, cependant, avant d'affirmer le diagnostic de bacille de Whitmore, un cobaye est inoculé par voie sous-cutanée dès le lendemain de l'isolement. Cinq jours après, il ne présente aucun symptôme, le germe est alors repris et étudié plus attentivement. Dans les cultures les plus anciennes on voit à ce moment de très nom-

breuses spores déformant d'une manière si particulière le corps bactérien que le diagnostic de *Bacillus laterosporus* Laubach 1916 peut être porté sans autre investigation. Ce germe, selon le manuel de Bergey, a pour habitat, le sol, l'eau, les poussières, aussi doit-on le considérer dans ce cas comme provenant d'une souillure accidentelle. Selon la même source, il serait largement répandu ; ce n'est certes pas cependant un germe habituel de souillure, du moins dans les conditions locales.

En 1950, 22 souches de bacilles mésophiles sporulés, provenant du milieu extérieur, ont été étudiées à l'Institut Pasteur de Saigon par P. de Lajudie [2] ; aucune d'entre elles n'appartenait à l'espèce *B. laterosporus*. Nous n'avions nous-même jamais rencontré ce germe, ni trouvé mention de son existence dans les archives du laboratoire.

Seules les conditions particulières de son isolement ont pu, un moment, faire envisager le diagnostic de bacille de Whitmore pour un germe qui en diffère par tant de caractères ; il n'y a en effet aucune difficulté réelle de diagnostic lorsque les circonstances n'aiguillent pas l'esprit vers la recherche d'un germe pathogène.

Il a paru intéressant de relater ce cas de contamination accidentelle aussi curieux par sa rareté que par le problème de pratique qu'il a posé.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] Communication à la Soc. Méd. Chir. des F. T. E. O., 1948.  
[2] Communication à la Soc. Franç. de Microbiologie, 1951.

### ÉTUDE D'UNE ESPÈCE NOUVELLE DU GENRE *ZUBERELLA* : *Z. CONSTELLATA* n. sp.

par M. MARTRES, E. R. BRYGOO et H. THOUVENOT.

(Service des Anaérobies. Instituts Pasteur de Paris et Saigon.)

Dans le pus d'une dacryocystite, prélevé chez un Vietnamien (1) et survenu après un phlegmon du sac lacrymal, l'examen direct montrait de nombreux polynucléaires et d'abondants bâtonnets Gram-négatifs ne croissant pas en aérobiose. Leur ensemencement en milieu anaérobie, additionné de sérum ou d'extrait globulaire, a donné une culture pure d'un anaérobie strict répondant à une espèce nouvelle dont voici la description :

*Morphologie* : Bâtonnet initialement polymorphe qui, après culture en série, devient droit, court, fin, isolé ou en très courtes chaînettes de 2 ou 3 éléments. Longueur, 1,8  $\mu$  ; largeur, 0,5  $\mu$ . Ni spore, ni

(1) Par le Dr d'Haussey, que nous remercions très vivement pour l'envoi de ce matériel. Ce malade hospitalisé à l'Hôpital militaire Coste, à Saigon, a guéri après incision du phlegmon.

capsule ; Gram-négatif ; mobilité très nette en rotation giratoire. Ciliature inconnue.

*Physiologie* : Anaérobie strict, thermorésistance nulle, longévité très faible (huit à dix jours), pouvoir réducteur élevé (safranine et rouge neutre réduits), sérophilie obligatoire ; le sérum peut être remplacé par l'extrait globulaire.

*Cultures* : Légèrement gazogènes et inodores.

*Gélose profonde + sérum* : Petites colonies punctiformes, d'apparition lente, qui, après huit jours d'étuve, atteignent 1 à 2 mm de diamètre et apparaissent constituées d'un centre opaque, lenticulaire, entouré d'une constellation de minuscules colonies. Quelques bulles de gaz.

*Eau peptonée + sérum* : Léger trouble.

*Bouillon VF glucosé + sérum* : Trouble et dépôt.

*Gélatine + sérum* : Non liquéfiée.

*Lait + sérum* : Coagulation lente (trois semaines) et partielle, avec hydrolyse des lipides.

*Protéines coagulées* : Non attaquées.

*Glucides* : Glucose maltose et amidon fortement fermentés.

Lévulose, galactose, saccharose, lactose et glycérine faiblement fermentés.

*Caractères biochimiques* : Les nitrates sont réduits en nitrites en présence de tous les glucides fermentés. Les sulfites ne sont pas réduits en sulfures. La fermentation du bouillon VF glucosé à 1 p. 100 abaisse en huit jours le pH à 4. L'acidité volatile totale atteint à ce moment 0,588 g par litre. Elle est constituée par de l'acide acétique pur. Pas d'acide fixe. L'ammoniac titre 0,136 g par litre. Les autres corps détectés sont :  $\text{SH}_2$ , aldéhydes, cétones et éthanol. La recherche de l'uréase est restée négative.

*Pouvoir pathogène* : Les cultures ne sont pas pathogènes pour les animaux d'expérience. Il n'y a pas de toxine dans ces cultures. Toutefois les cultures totales provoquent l'hémopeptolyse des globules rouges de mouton, alors que les filtrats ne sont ni hémolytiques, ni hémopeptiques.

*Position dans la systématique* : Bâtonnet Gram-négatif asporulé, non capsulé et mobile, cette espèce appartient au genre *Zuberella* Prévot.

A l'intérieur de ce genre, elle fait partie du groupe des espèces gazogènes [4]. Elle se distingue facilement de :

*Z. serpens*, qui est morphologiquement très différent et liquéfie la gélatine, colonies lenticulaires ;

*Z. clostridiiformis*, qui est effilé aux extrémités et ne coagule pas le lait, colonies lenticulaires ;

*Z. aquatilis*, long, filamenteux, lait non coagulé ; absence de culture en gélose profonde.

Elle se rapproche au contraire de deux autres espèces dont elle semble assez voisine : *Z. nova* et *Z. proeacuta*. Elle en diffère cependant par sa mobilité spéciale (giratoire), par ses colonies constellées, sa sérophilie obligatoire, la coagulation lente du lait et la non-liquéfaction de la gélatine, la réduction des nitrates et le type fermentaire acétique pur.

Il s'agit donc bien d'une espèce nouvelle pour laquelle nous proposons le nom de *Zuberella constellata* en raison de ses colonies constellées.

## BIBLIOGRAPHIE

[1] A.-R. PRÉVOT. Manuel de classification des anaérobies, 1948, 2<sup>e</sup> édit., p. 89.

## PRÉSENCE AU MAROC D'UNE INFECTION PORCINE ÉPIZOOTIQUE DU TYPE DES PNEUMONIES A VIRUS

par L. PLACIDI.

(Rabat.)

Une grave épizootie porcine, sévissant depuis trois mois et demi au Maroc, nous a permis de mettre en évidence un ultra-virus qui, par son tropisme purement pulmonaire, se différencie nettement du virus pestique et paraît devoir être rattaché à un des virus en cause dans le groupe spécial des viroses « pneumonie à virus ».

Il nous a semblé intéressant de rapporter dès maintenant les éléments essentiels de nos observations et recherches.

L'apparition de la maladie semble coïncider avec des variations météorologiques. D'autre part, l'affection s'est déclarée presque en même temps dans 3 foyers éloignés l'un de l'autre et sans qu'aucun rapport puisse être établi entre eux.

L'allure très contagieuse de la maladie, qui a provoqué l'extermination de plusieurs élevages, et qui atteint les adultes autant que les jeunes, a fait poser, dès l'origine, le diagnostic de peste porcine, bien que l'évolution épidémiologique ait pu faire mettre en doute ce dernier diagnostic. De plus, la maladie sévit sur des animaux vaccinés depuis peu contre la peste et en pleine période d'immunité ; la sérumsation massive spécifique, avec plusieurs sérums d'origine différente, est pratiquement dénuée d'efficacité. Les examens nécropsiques ne permettent d'observer aucune des lésions classiques de la peste, mais on trouve très régulièrement, chez les animaux morts ou sacrifiés après un certain temps de maladie, une pneumonie ou pleuro-pneumonie, presque toujours compliquée dans les conditions naturelles d'une infection microbienne, à flore variée, d'où l'on peut isoler une *Pasteurella* qui, dans l'épizootie actuelle, se montre presque dépourvue de virulence pour les espèces autres que le porc.

La gravité des lésions surajoutées est telle que l'on a pu observer, dans les cas d'évolution lente (de vingt à quarante jours), la nécrose totale d'un poumon avec symphyse pleurale et pleurésie purulente, à l'exclusion de toute autre lésion.

Le filtrat de sang dilué sur bougie Chamberland L3 reproduit la



maladie sur des porcs neufs d'origine spécialement contrôlée, si l'on inocule une dose suffisante. Le filtrat de poumon donne le même résultat, de même que le sang ou le broyat de poumon débarrassé de germes par les antibiotiques (pénicilline, streptomycine). La courbe thermique, obtenue par l'inoculation expérimentale, présente quelques différences avec celle de la peste. La maladie expérimentale évolue sans l'adjonction de germes, et les lésions, pourtant spécifiquement pulmonaires, peuvent être à peine marquées. L'action des germes n'est pas douteuse dans l'évolution naturelle. Elle est peut-être essentielle, comme semble le prouver l'action des antibiotiques, qui ont permis, expérimentalement, plusieurs cas de guérison.

D'autre part, 2 porcelets ont été contaminés par cohabitation. L'un des deux a été traité, depuis le début, par les antibiotiques ; l'autre n'a reçu aucun traitement. Celui-ci est mort le premier, avec des lésions accentuées du poumon. L'animal traité a été sacrifié le dix-neuvième jour. Les lésions, localisées comme toujours, à l'appareil respiratoire, sont très réduites. Le virus est présent dans le filtrat du broyat de poumon et reproduit la maladie.

On constate, expérimentalement, que le sérum antisuipestique, de l'Institut Pasteur d'Alger, utilisé à haute dose (100 cm<sup>3</sup> pour un porcelet de 30 kg), protège le porcelet contre l'inoculation, quarante-huit heures après, de 1 cm<sup>3</sup> de filtrat de sang. L'animal infecté présente une hyperthermie de 1°5 à 2°, pendant les cinq jours qui suivent l'injection virulente. Mais un deuxième porcelet témoin, du même poids et de la même portée, ayant reçu la même dose de sérum normal de cheval, résiste également après avoir présenté toutefois une réaction générale très violente et une hyperthermie de 1°5 à 2°, qui a persisté pendant huit jours. L'animal se relève cependant le treizième jour et paraît résister définitivement. On peut donc douter de l'action spécifique du sérum. Cependant, la question doit peut-être se poser de la parenté immunologique de ce virus avec celui de la peste porcine.

Il s'agit, en tout cas, d'un virus purement pneumotrope, à localisation très stricte, différent, de toute évidence, de celui de la peste porcine. Dans l'état actuel de nos recherches, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse d'un virus nouveau, voisin de ceux décrits par Pullar (1949) en Australie, puis par Gulrajni et Beveridge, et enfin, tout récemment par A. O. Betts.

## NUMÉRATION DIRECTE DES BACTÉRIES

par V. BONIFAS et E. NOVEL.

*(Institut d'Hygiène, Université de Genève  
et Laboratoire cantonal d'analyses bactériologiques.)*

La numération directe des bactéries contenues dans une suspension a fait l'objet de recherches déjà fort anciennes qui ont abouti à l'utilisation de techniques plus ou moins faciles et rapides. Citons entre autres Eberle (1896) [2], Liebreich (1910) [4], Henriques (1923) [3] ; Amann (1911) [4] utilise l'éclairage à fond noir, qui lui permet d'effec-

tuer une numération des germes de l'eau en une heure environ.

Le principe de ces techniques consiste à disposer la suspension en couche mince entre un support de verre transparent optiquement plan et un couvercle en verre plan. Que le fond soit gravé ou que le réseau soit fourni par un dispositif approprié de l'oculaire du microscope, on compte les bactéries en fonction des surfaces élémentaires du réseau. Il existe un grand nombre de cellules ou chambres gravées : Thoma, Bürker, Malassez, Agasse-Lafont, Hawksley, etc., dont la plupart sont destinées à l'hématimétrie ; de telles cellules ont une profondeur de 100  $\mu$ . La cellule de Hawksley, destinée aux numérations bactériologiques, est profonde de 20  $\mu$ , mais la lame de verre dans laquelle elle est taillée est mince, donc fragile.

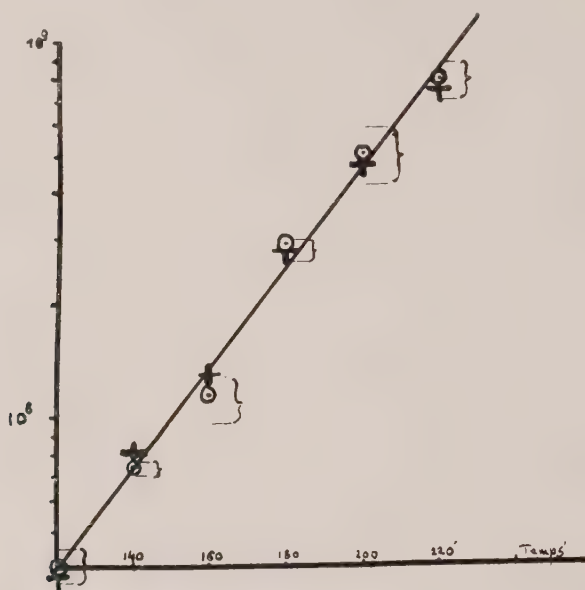
Nous avons essayé de modifier les cellules hématimètres du commerce et, grâce aux bons soins d'une fabrique d'instruments de précision de la place, nous disposons de trois hématimètres modifiés à deux cellules qui sont profonds respectivement de 11, 16 et 16  $\mu$ . Il est très difficile de prévoir la profondeur qu'aura la cellule après le rodage, mais il est facile de la mesurer, avec une extrême exactitude, au niveau de chaque réseau. Ces derniers posséderont donc un coefficient propre par lequel on multipliera le nombre moyen de bactéries comptées dans un carré élémentaire (1/400 mm<sup>2</sup>), pour trouver le nombre de bactéries par centimètre cube. Ce coefficient, pour une profondeur de 16  $\mu$ , par exemple, est de  $2,5 \times 10^7$ .

La numération, pour être utile, ne doit exiger que cinq minutes environ. Il est nécessaire, pour cela, d'utiliser un microscope comportant un dispositif d'éclairage à contraste de phase, avec un objectif à sec grossissant quarante fois, et un oculaire, dix fois. Ces rapports permettent d'observer la profondeur presque totale de la couche liquide avec la même mise au point de l'objectif.

La valeur des nombres obtenus est exacte pour autant que l'on compte les bactéries contenues dans trois réseaux de 16 carrés élémentaires, et que le nombre moyen de bactéries par carré ne soit pas inférieur à 2,5. Si ce nombre est plus petit il faudra compter les bactéries dans 100 carrés, ou, mieux encore, dans tout le réseau. Le nombre maximum de bactéries que l'on peut compter dans un carré ne dépasse guère 30, et encore ce nombre ne peut-il être atteint que par un observateur exercé. Les concentrations qui permettent donc la numération directe sont comprises entre 2,5 et  $75 \times 10^7$  bactéries par centimètre cube. Il faut recourir à la dilution préalable pour faire le compte d'une suspension plus concentrée.

Nous avons comparé les résultats de cette technique avec ceux de la dilution suivie de l'étalement sur gélose : ceux de la numération directe sont plus exacts. Nous donnons comme exemple la courbe de croissance de *E. coli* B en bouillon tryptone Difco ; les numérations ont été faites toutes les vingt minutes, à raison d'une numération à la cellule-hématimètre et de 4 étalements de la même dilution sur gélose. La moyenne des 4 étalements recouvre le nombre trouvé par la numération directe (voir graphique). Nous avons fait figurer sur le graphique les résultats extrêmes de chaque série d'étalements sur gélose, pour donner une idée de l'écart entre les nombres individuels fournis par la méthode d'étalement.

La numération directe est applicable à de nombreuses mensurations. Elle a l'avantage de permettre l'estimation du nombre de bactéries



Croissance de *E. coli* B en bouillon. En abscisses, temps; en ordonnées, log. de la concentration bactérienne. +, numération directe; O, compte des colonies.

**Période exponentielle de la croissance d'une culture de *E. coli*, souche B, en bouillon tryptone Difco.**

TEMPS en minutes	NUMÉRATION directe	NUMÉRATION DES COLONIES					
		Dilution	Petri I	Petri II	Petri III	Petri IV	Population
120 . . .	$3,8 \times 10^7$	$1/10^4$	406	409	419	371	$4 \times 10^7$
140 . . .	$8,2 \times 10^7$	$2/10^5$	153	144	142	151	$7,4 \times 10^7$
160 . . .	$13,0 \times 10^7$	$1/10^5$	99	115	144	111	$11,5 \times 10^7$
180 . . .	$28,0 \times 10^7$	$1/10^5$	278	270	300	287	$28,4 \times 10^7$
200 . . .	$49,0 \times 10^7$	$1/10^6$	53	43	50	60	$50,0 \times 10^7$
220 . . .	$75,0 \times 10^7$	$1/10^6$	83	91	76	71	$80,0 \times 10^7$

contenues dans des amas ou des chaînettes, si ces derniers ne sont pas trop gros. Elle est presque indispensable pour établir des courbes de survie ou de croissance.

Nous pensons que n'importe quelle fabrique d'instruments de précision qui travaille les surfaces de verre optiquement planes est capable de diminuer l'épaisseur des bandes d'appui d'une cellule hématimètre et de mesurer la différence de niveau entre ces dernières et le plan du réseau.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. AMMANN. *Zentralbl. Bakt.* II, 1911, **29**, 381.
- [2] R. EBERLE. *Zentralbl. Bakt.* I, 1896, **19**, 2.
- [3] O.-M. HENRIQUEZ. *C. R. Biol.*, 1923, **88**, 819.
- [4] E. LIEBREICH. *Deutsche med. Wochensh.*, 1916, p. 453.

## LE PHAGOCYTE ÉLÉMENT SÉLECTEUR DE TOXINES

par L. DUCHON.

(Laboratoire de Secteur de l'Hôpital Trousseau.)

Sur le graphique, présenté lors d'une précédente communication [1], les influences contraires d'une toxine et d'un lysat microbien sur l'activité bactéricide des phagocytes s'inscrivaient avec netteté. La recherche de la résultante de ces influences s'exerçant simultanément nous a paru d'un certain intérêt, tant du point de vue particulier de la défense antimicrobienne que du point de vue plus général du mécanisme de l'infection.

L'expérience a été réalisée dans deux conditions : *in vitro* et *in vivo*.

*In vitro*. — I. Si nous prenons pour élément d'expérimentation la toxine d'un pathogène commun, le problème se trouve compliqué par la possibilité de la présence d'une antitoxine sérique. C'est le cas du streptocoque n° 1 de l'infection grippale, récemment étudié [2].

De ce fait, manipulons comme suit et suivant les conditions prescrites antérieurement [3] :

Préparons : a) une toxine microbienne (streptocoque n° 1 par exemple).

b) Une suspension microbienne (*Streptococcus hemolyticus* à 1/50).

c) Par sang, 12 tubes de 1 cm<sup>3</sup> de sang défibriné dont :

3 tubes reçoivent I goutte de la suspension microbienne (tubes témoins).

3 tubes reçoivent spécifiquement I goutte d'une dilution de lysat microbien (soit ici lysat de *Streptococcus hemolyticus*).

3 tubes reçoivent I goutte d'une dilution de la toxine du streptocoque n° 1.

3 tubes reçoivent I goutte d'une dilution à la fois de toxine et lysat.

Ces 3 dilutions se feront à un titre faible, 10<sup>-7</sup> par exemple, et toujours dans les mêmes conditions que précédemment, c'est-à-dire avec

la suspension microbienne utilisée. Ainsi, pratiquement, la même quantité de microorganismes est, dans chaque tube, mise au contact des phagocytes soumis à des influences différentes.

Les tubes sont portés à l'étuve, agités et ensemencés à la fin de la huitième heure.

*Observation.* — a) L'examen des chiffres des richesses microbiennes des tubes à lysat, par rapport à ceux des tubes témoins, va nous permettre de sélectionner les sangs propres à l'observation. Il faut, évidemment, que les phagocytes d'un sang donné soient sensibles à l'action du lysat et qu'ils révèlent une activité bactéricide nette sous son action. Nous ne retiendrons donc que les sangs dont les tubes à lysat donnent des richesses microbiennes inférieures à celles des témoins.

b) L'examen des résultats des tubes à toxine par rapport à ceux des tubes témoins va nous permettre une seconde sélection : nous ne retiendrons des sangs, primitivement sélectionnés, que ceux pour lesquels l'activité de la toxine n'est pas neutralisée par une antitoxine sérique, c'est-à-dire ceux qui, pour ces tubes à toxine, donnent des richesses microbiennes supérieures à celles des témoins.

(On comprendra aisément que dans cette expérience les sangs dont l'activité bactéricide est perturbée par une cause quelconque autre que celle du lysat ou celle de l'action toxique ne sauraient rien révéler.)

La sélection définitive, ainsi réalisée, représente donc des sangs dont la richesse microbienne des témoins se trouve inscrite nettement entre le chiffre des tubes à lysat moins élevé et celui des tubes à toxine plus élevé.

Reportons-nous maintenant aux tubes lysat + toxine de chacun de ces sangs.

Constatations : Non seulement *toujours* le chiffre trouvé est supérieur à celui des tubes à lysat, mais souvent à celui des témoins et assez souvent voisin de celui des tubes à toxine.

Ainsi le phagocyte affirme une affinité nette pour la toxine. *In vitro* donc la présence d'une toxine exerce une action empêchante plus ou moins intense et parfois totale sur la fonction de défense provoquée par le lysat.

Le phénomène observé avec cette toxine du streptocoque n° 1 peut être observé avec n'importe quelle autre toxine ; il en est même certaines qui donnent des résultats plus expressifs que d'autres. C'est là d'ailleurs un phénomène très général observable quel que soit le produit toxique ainsi qu'il suit :

II. Ayons recours cette fois à un antibiotique : la pénicilline, par exemple. Ici nous manipulons plus simplement, nous évitons la complication de la recherche de la présence d'une antitoxine sérique. L'interrogatoire du donneur nous permettra en effet, en général avec précision, d'éliminer les sangs de ceux qui ont été antérieurement soumis à cette thérapeutique ; il convient d'éliminer même ceux qui l'ont reçue par voie buccale.

Nous avons donc ainsi à notre disposition des sangs qui ne véhiculent sûrement pas d'antitoxine.

Comme ci-dessus, préparons alors 9 tubes seulement de 1 cm<sup>3</sup> de sang défibré :



- 3 tubes témoins,
- 3 tubes à lysat,
- 3 tubes à lysat + pénicilline.

Le titre des 2 dilutions sera au maximum de  $10^{-8}$  afin d'éliminer sûrement toute activité antibiotique de la pénicilline et de laisser agir seulement son activité toxique [4].

Nous n'avons donc plus à retenir ici qu'une seule sélection : celle des sangs donnant avec le lysat des richesses microbiennes inférieures à celles des témoins.

Constatations : *Toujours* l'activité bactéricide provoquée par le lysat se trouve plus ou moins empêchée par la présence de la pénicilline. Les tubes à lysat + pénicilline révèlent là encore cette affinité du phagocyte pour le produit toxique.

*In vivo*. — Cette dernière expérimentation nous a incité à profiter des antibiotiques pour explorer *in vivo* les manifestations des produits toxiques sur les phénomènes de défense. C'est même avec une certaine aisance que nous avons pu réaliser cette exploration par ailleurs évidemment irréalisable expérimentalement dans de telles conditions.

Nous ne donnerons aujourd'hui que ce simple aperçu :

Éliminons cette fois les sangs d'individus qui n'ont jamais été soumis aux antibiotiques.

Retenons seulement ceux dont les renseignements précis indiquent une thérapeutique subie antérieurement, ceux qui sont « sous l'influence d'antibiotiques » (mais en dehors de toute action antibiotique proprement dite). Nous en reparlerons.

Pour chaque sang utilisons 6 tubes de 1 cm<sup>3</sup> de sang défibriné et comme ci-dessus préparons :

- 3 tubes témoins,

3 tubes à lysat microbien (toujours spécifiquement par rapport à la suspension microbienne utilisée) et à titres faibles,  $10^{-7}$  par exemple.

Constatations : en dehors de toute action antibiotique qui apporte évidemment une perturbation, il est quasiment constant que le chiffre des richesses microbiennes des tubes à lysat soit *supérieur* à celui des témoins (*sic*). Or, rappelons que dans une précédente communication [1] nous avons dit que l'excitation de l'activité bactéricide des phagocytes par un lysat microbien s'observait à peu près dans la majorité des sangs et nous ajoutons « non sélectionnés ». Donc, *in vivo*, encore sélectivité du phagocyte pour la toxine.

*En résumé*, le phagocyte sélectionne toujours la toxine quand *in vitro* on la met à son contact en compagnie d'un lysat microbien excitateur de sa fonction bactéricide. Sélection qui se traduit *in vivo* par l'inhibition de cette fonction.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [4] L. DUCHON. *Ces Annales*, 1952, **82**, 655.
- [2] L. DUCHON. *Ces Annales*, 1952, **82**, 779.
- [3] L. DUCHON. *Ces Annales*, 1952, **82**, 228.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

**Etude comparative de quelques milieux de culture modernes utilisés pour l'isolement du bacille tuberculeux**, par J. R. CALMELS et H. BOISVERT.

**A propos de la détermination quantitative de l'antistreptokinase**, par A. BERTOYE et P. DETOLLE.

**Caractères biochimiques des souches de peste « sauvage » du Kurdistan**, par M. BALTAZARD et P. ASLANI.

**Immunologie de l'hémolyse. Modalités de l'action inhibitrice du sérum normal**, par R. LAPORTE.

**Les groupes sanguins des moutons**, par R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, A. EYQUEM et P. MLLOT.

## ELECTIONS

MM. Jacques Monnier, P. de Lajudie, A. Vaisman, E. Brygoo, J. Viallier, Jacques Roux et R. Vargues, M<sup>me</sup> S. Pinnert-Syndico, M<sup>lle</sup> D. Courtillet, M<sup>me</sup> S. Béguin et M<sup>lle</sup> O. Coppier.

Sont également élus à titre étranger : M. le professeur E. G. D. Murray, MM. M. Saint-Martin, J. M. Desranleau, M. Panisset et E. Schmid.

## LIVRES REÇUS

**E. Carlinfanti et F. Magrassi.** — *Trattato di Malattie Infettive*. Edizioni Scientifiche Italiane, Napoli (1951), 2 volumes, 1226 et 1220 pages.

En deux épais volumes remarquablement présentés et illustrés, F. Magrassi et le regretté Carlinfanti présentent l'état actuel de nos connaissances sur les maladies infectieuses. Une liste imposante de collaborateurs, une bibliographie assez soignée, un total de 2 500 pages disent l'ampleur de l'œuvre.

L'évolution de la science s'affirme particulièrement dans l'ordre où sont traités les sujets et la part respective qui leur est donnée. C'est dans le premier volume, en effet, que sont traitées les maladies à virus, ce qui met l'accent sur l'importance relative qu'elles ont prise au cours de ces dernières années et sur la part prépondérante qu'elles occupent aujourd'hui dans les syndromes infectieux. Non seulement les principales maladies à virus, grippe, psittacose, maladie de Nicolas



et Favre, fièvre jaune, mononucléose infectieuse, etc., sont successivement traitées, mais les syndromes pouvant être dus à plusieurs virus ont fait l'objet de chapitres séparés ; c'est ainsi que Magrassi a traité les pneumopathies dues aux virus et aux rickettsies, d'une façon qui aidera le clinicien à se reconnaître au milieu des différents agents étiologiques des syndromes pneumoniques et à en faire le diagnostic. Les maladies à virus encore insuffisamment connues comme la fièvre prétiibiale ou les diarrhées infantiles à virus, ou qui constituent encore des curiosités comme la fièvre à tiques du Colorado ou la lymphocytose aiguë, ont été consciencieusement traitées. La maladie rhumatismale a été comprise dans les maladies à virus.

Dans le deuxième volume, les maladies classiques dues aux bactéries, aux rickettsies et aux bartonelles se trouvent réunies et traitées avec le même soin du détail et de la documentation. Là encore, à côté de maladies classiques (citons en particulier le bel article de Carlinfant sur le choléra), les maladies plus rares, les infections streptobacillaires et l'érésipéloïde ont trouvé leur place. Les grands syndromes comme l'endocardite lente et l'arthrite infectieuse ont été dégagés et sont traités séparément. Le typhus, traité par Musotto, a reçu l'ampleur que méritent un tel sujet et les travaux récents dont il a été l'objet.

Il est à peu près inévitable que dans un traité de cette importance on relève une certaine inégalité dans la valeur des articles. Cependant les sujets principaux ont tous été rédigés par des auteurs particulièrement qualifiés et l'ensemble de l'ouvrage constitue un monument imposant qui fait le plus grand honneur à ses rédacteurs et aura une place de choix dans la bibliographie de langue italienne.

P. L.

**Vincent J. Derbes et Thomas E. Weiss.** — *Untoward reactions of cortisone and ACTH*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1952. 51 p. Prix : 8 sh. 6 d.

Parmi les nouveaux médicaments que possède actuellement la médecine, la cortisone et l'ACTH sont parmi les plus importants. Leur emploi ne remonte pas encore très loin et la période d'observation est par conséquent encore assez courte. Cependant, à côté d'actions thérapeutiques remarquables, on a déjà pu mettre en évidence des effets nocifs assez nombreux et variés. Ce livre a pour but d'attirer l'attention sur les réactions fâcheuses auxquelles on s'expose par l'emploi de ces drogues. Un premier chapitre consacré au mécanisme de l'action physiologique de la cortisone et de l'ACTH révèle que cette action est extrêmement complexe et que l'administration de ces médicaments est susceptible d'apporter au tableau clinique de nombreuses modifications auxquelles on ne pouvait s'attendre avant l'extension de leur emploi thérapeutique. Ils agissent d'abord sur les glandes à sécrétion interne (hypophyse, surrénales, pancréas, thyroïde, glandes sexuelles), sur les électrolytes du sang, sur le système cardiovasculaire (pression sanguine, cœur, électrocardiogramme). Leur rôle dans les infections est particulièrement important, car ils peuvent modifier les critères habituels de celles-ci : par exemple, ils suppriment la fièvre sans agir sur l'agent infectieux, ils provoquent des abcès, ils aggravent de nombreuses

maladies (poliomyélite, grippe, tuberculose, etc.). Leur action s'étend également sur le système musculaire et osseux (la croissance de la souris est parfois arrêtée par la cortisone, les fractures ne guérissent pas chez le lapin, etc.), sur le tissu cutané et sous-cutané, les muqueuses (hirsutisme, acné, urticaire, etc.) et sur le système nerveux : on a noté des troubles assez graves de celui-ci, mais survenant surtout chez les sujets prédisposés et s'apaisant en général avec la cessation du traitement. Enfin l'action sur le tube digestif s'étend depuis les nausées jusqu'à la perforation d'ulcères duodénaux. Un dernier chapitre donne quelques conseils pour éviter toutes ces réactions fâcheuses.

H. T.

**K. A. Bisset.** — *Bacteria*. E. S. Livingtone, Edimbourg et Londres, 1952. 112 p. Prix : 20 sh.

L'auteur s'est donné pour but de présenter une classification simple des bactéries, basée à la fois sur leur morphologie et sur le concept de l'évolution par perte du pouvoir de synthèse. Le livre est divisé en 25 chapitres consacrés, outre quelques chapitres de notions générales et un chapitre sur le bactériophage, à chacune des familles de bactéries envisagées. Il est illustré de 38 figures et comprend un index bibliographique qui en facilite l'usage.

H. T.

**G. E. W. Wolstenholme.** — *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology. Volume I. Steroid hormones and tumour growth. Steroid hormones and enzymes*. 1 vol. 315 p., 48 fig., J. et A. Churchill, Londres, 1952. Prix : 30 sh.

La première partie de ce livre est constituée par les comptes rendus *in extenso* de deux des Colloques internationaux sur l'Endocrinologie. On y trouvera les exposés des différents spécialistes de la question et les discussions qui les ont suivis. Cette partie traite du rôle des hormones stéroïdes dans la pathogénie du cancer, et en particulier des tumeurs mammaires, de l'emploi des stéroïdes dans la thérapeutique du cancer et de l'action de l'ACTH et de la cortisone. La seconde partie, qui traite des hormones stéroïdes et des enzymes, comprend les résumés rédigés par les auteurs dont les travaux sont discutés dans les discussions publiées *in extenso* qui suivent ces résumés. De nombreuses références sont jointes à chacune de ces deux sections.

H. T.

Le Gérant : G. MASSON.